

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

*Nuovi copoliesteri alifatici
da miscelazione reattiva
per impieghi nell'ingegneria tissutale del miocardio*

Elaborato in
Fondamenti di Chimica

Relatore:

Prof.ssa Nadia Lotti

Presentata da:

Maria Brecciaroli

Correlatori:

Prof. Emanuele Giordano

Ing. Matteo Gigli

Dott. Marco Govoni

Sessione Prima
Anno Accademico 2012/2013

Primo capitolo. Introduzione	1
1.1 Biomateriali	1
1.1.1 Introduzione ai biomateriali e definizione	1
1.1.2 Classificazione	3
1.2 Materiali polimerici	7
1.2.1 Definizione e classificazione	7
1.2.2 Struttura	7
1.2.3 Grado di polimerizzazione e peso molecolare	10
1.2.4 Cristallinità e amorfismo	12
1.2.5 Proprietà termomeccaniche	13
1.2.6 Materiali polimerici per uso biomedico	16
1.3 Copolimeri	19
1.3.1 Copolimeri a blocchi	20
1.4 Poliesteri alifatici	22
1.4.1 Strategie di sintesi	24
1.4.2 Proprietà	26
1.5 Biodegradazione	27
1.5.1 Degradazione idrolitica	29
1.5.2 Fattori che influenzano la biodegradazione	30
1.6 Poliesteri e copoliesteri alifatici per uso biomedicale	32
1.7 Ingegneria tissutale	36

1.7.1	Cellule	37
1.7.2	Scaffolds	38
1.7.3	Distribuzione dei segnali in ingegneria tissutale	40
1.8	Biocompatibilità	41
1.8.1	Test <i>in vitro</i>	42
1.8.2	Test <i>in vivo</i>	45
1.8.3	Trials clinici	47
1.8.4	Emocompatibilità	48
Secondo capitolo. Scopo		51
Terzo capitolo. Materiali e Metodi		54
3.1	Sintesi	54
3.1.1	Sintesi degli omopolimeri	54
3.1.2	Sintesi dei copolimeri, <i>reactive blending</i>	57
3.2	Stampaggio in film	59
3.3	Caratterizzazione molecolare	60
3.3.1	Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, NMR	60
3.3.2	Cromatografia a permeazione di gel, GPC	65
3.4	Caratterizzazione termica	66
3.4.1	Termogravimetria, TGA	66
3.4.2	Calorimetria differenziale a scansione, DSC	68
3.4.3	Termoanalisi dinamico-meccanica, DMTA	71
3.5	Caratterizzazione strutturale	73

3.5.1	Diffrazione a raggi X, XRD	73
3.5.2	Misura dell'angolo di contatto, WCA	75
3.6	Caratterizzazione meccanica	77
3.7	Studi di degradazione idrolitica	79
3.8	Test di biocompatibilità	80
3.8.1	Sterilizzazione dei polimeri	80
3.8.2	Cardiomioblasti ventricolari di embrione di ratto: cellule H9c2	80
3.8.3	Tripsinizzazione	81
3.8.4	Conta cellulare mediante camera di Burker	82
3.8.5	Test di vitalità e crescita cellulare: the PrestoBlue® assay	83
3.8.6	Prove di citotossicità indiretta	83
3.8.7	Prove di citotossicità diretta	84
Quarto capitolo. Risultati e Discussione		85
4.1	Caratterizzazione molecolare	85
4.2	Caratterizzazione termica e diffrattometrica	90
4.3	Caratterizzazione meccanica	97
4.4	Misure di bagnabilità	99
4.5	Studi di degradazione idrolitica	100
4.6	Test di biocompatibilità	103
Quinto capitolo. Conclusioni		107

1.1 Biomateriali

1.1.1 Introduzione ai biomateriali e definizione

Con il termine biomateriali si indicano quei materiali, più o meno innovativi ed ingegnerizzati, che rispondono al bisogno dell'uomo di sostituire o integrare tessuti ed organi, non più attivi dal punto di vista funzionale o metabolico, danneggiati da eventi traumatici o patologici.

Negli ultimi trentacinque anni, lo sviluppo e la diversificazione di biomateriali per la realizzazione di dispositivi e impianti medicali ha portato il mondo della medicina verso quella che è stata la più grande rivoluzione terapeutica dei nostri tempi. Tale sviluppo è stato possibile grazie al forte aumento delle conoscenze relative alle interazioni tra organismi viventi e materiali: è chiaro, infatti, che l'impiego di materiali all'interno del corpo per la sostituzione di organi o tessuti è tanto più sicuro e dà risultati tanto più promettenti quanto più chiare e prevedibili sono queste interazioni.

Ad oggi, la scienza dei biomateriali costituisce un settore di crescente interesse ed in rapido sviluppo all'interno del sistema culturale ed economico mondiale. Si stanno, infatti, investendo molte risorse, finanziarie ed umane, allo scopo di mettere a punto biomateriali sempre più sofisticati e specifici, in grado di interfacciarsi sempre meglio con i sistemi biologici del corpo umano, superando gli attuali limiti chimico-fisici. Grazie al controllo dell'intero processo produttivo, sempre più accurato, si è ottenuto un crescente miglioramento della microstruttura e, conseguentemente, delle prestazioni, cui ha corrisposto una continua espansione degli impieghi. Molti biomateriali di recente messa a punto costituiscono, infatti, dei veri e propri materiali innovativi, attribuito con cui si indica, in generale, una serie molto ampia di composti, che si differenziano dai prodotti convenzionali poiché progettati su misura per far fronte ad un'esigenza specifica e predefinita, funzionalizzandoli ad assolvere la loro funzione in maniera 'intelligente' (F. Causa *et al.*, 2007).

La definizione di biomateriale sulla quale oggi esiste il più ampio consenso è quella che venne stabilita nel corso della *II International consensus conference on biomaterials*, tenutasi a Chester (Gran Bretagna) nel 1986: 'Si definisce biomateriale una sostanza non vivente concepita per interfacciarsi con i sistemi biologici al fine di valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo'.

Sono quindi esclusi dalla categoria dei biomateriali i materiali viventi, quali gli organi trapiantati, mentre sono inclusi in questa definizione i tessuti di origine biologica trattati e non più viventi; inoltre, nella

definizione non si fa riferimento alla durata del contatto tra materiale e organismo ospite, ma si richiede espressamente che tale contatto avvenga affinché si possa parlare di biomateriale.

Il problema nell'utilizzo dei biomateriali, o meglio, dei dispositivi con essi realizzati, non è solo da ricercarsi nella loro funzionalità all'interno dell'organismo, ma anche nella loro tollerabilità da parte di quest'ultimo: un biomateriale deve essere in grado di interagire positivamente con i tessuti, mentre esplica quelle funzioni per le quali è stato progettato ed impiegato.

Dato lo scopo per il quale i biomateriali sono concepiti si è, quindi, reso necessario stabilire che questi, come prodotti commerciali, rispettino determinati standard che tengono conto degli aspetti biologici, meccanici e chimici, al fine di garantirne un impiego sicuro per pazienti e operatori.

Tra questi, il requisito fondamentale di un biomateriale è la compatibilità, vale a dire la capacità di svolgere la propria funzione senza provocare reazioni dannose o effetti indesiderati nel tessuto vivente con cui il materiale è a contatto. Tali reazioni indesiderate, che si esplicano principalmente in fenomeni infiammatori o di rigetto, possono derivare direttamente dall'interazione tra organismo e dispositivo o a seguito del rilascio da parte di quest'ultimo di sostanze tossiche, quali additivi o prodotti di degradazione.

Il concetto di compatibilità può essere esaminato più dettagliatamente considerandone i tre aspetti principali:

- compatibilità morfologica; aspetto che riguarda le interfacce dimensionali, relative a geometria e masse. Un dispositivo impiantabile deve avere forma e dimensioni tali da essere inseribile al posto del tessuto naturale ed interfacciarsi geometricamente con l'ambiente circostante nella maniera ottimale.
- compatibilità funzionale; aspetto che riguarda il ruolo svolto dal dispositivo rispetto al ruolo atteso. Questo deve infatti rispondere al maggior numero di caratteristiche funzionali possibili tra quelle richieste.
- compatibilità biologica o biocompatibilità; questa caratteristica può essere definita come la capacità di un materiale di non provocare da parte del sistema vivente nel quale è impiegato un insieme di reazioni sfavorevoli tali da pregiudicarne la possibilità di utilizzo per tutto il tempo necessario.

La compatibilità nel suo complesso è quindi un insieme di proprietà legate all'interazione fra organismo e dispositivo, interazione che sussiste sempre e comunque dato che quest'ultimo deve svolgere la sua funzione all'interno dell'organismo. Pertanto, nella progettazione di un qualsiasi dispositivo impiantabile occorre tenere sempre in considerazione questi tre aspetti legati alla compatibilità, i quali purtroppo non sono quasi mai noti in termini quantitativi a causa del carattere dinamico dell'interazione con l'organismo vivente. Spesso non risulta possibile nemmeno prevedere l'evoluzione delle condizioni di interfaccia, se non a livello probabilistico qualora si disponga di un'adeguata casistica clinica.

La valutazione della compatibilità è necessaria anche in quanto strettamente connessa al problema dell'affidabilità. Dato che spesso la manutenzione o sostituzione di dispositivi impiantabili risulta praticamente impossibile, l'affidabilità rappresenta una loro caratteristica indispensabile.

Dunque, la caratterizzazione di un qualsiasi biomateriale, e in generale dei dispositivi medici destinati ad un contatto con l'organismo, non può essere completa senza una valutazione circa la loro risposta biologica, allo scopo di esaminare le prestazioni del biomateriale in condizioni simili a quelle dell'ambiente biologico in cui verrà impiegato.

1.1.2 Classificazione

In base alle loro applicazioni mediche, i materiali venivano classificati in tal modo (H. Suh, 1998):

- materiali di I classe: non utilizzati a diretto contatto con i tessuti del corpo.
- materiali di II classe: biomateriali che prendono contatto con i tessuti solo in un primo momento o in momenti diversi ad intermittenza.
- materiali di III classe: sono costantemente a contatto con i tessuti dell'ospite.

Sono proprio i materiali della III classe quelli che oggi vengono definiti biomateriali o materiali biomedicali e ulteriormente suddivisi in tre categorie in base alle loro interazioni biologiche con i tessuti circostanti.

Abbiamo così:

- materiali bioinerti, che non producono, cioè, una risposta immunitaria nell'ospite e la loro struttura rimane inalterata dopo l'impianto nell'organismo umano.
- materiali bioattivi, i quali mimano il tessuto in cui sono stati impiantati e ne stimolano funzioni biologiche.
- materiali biodegradabili: vengono lentamente degradati dall'ospite e rimpiazzati con tessuto naturale rigenerato (Williams, 1987).

Un'altra più tradizionale classificazione è quella che suddivide i biomateriali in base alla loro natura chimico-strutturale, come avviene per i materiali in genere. Si individuano, così, cinque categorie di biomateriali: metallici, ceramici, biologici, compositi e polimerici. Ciascuna classe di biomateriali presenta caratteristiche proprie che ne rendono conveniente l'impiego in applicazioni mediche specifiche.

Metalli. I biomateriali metallici trovano un largo e diversificato impiego come materiali da costruzione per dispositivi medici. Vengono principalmente sfruttati nella fabbricazione di strumentario chirurgico, di protesi ortopediche e dentali, o parti di esse, e come mezzi di osteosintesi. Questi biomateriali risultano particolarmente indicati per la risoluzione di problemi legati alla sostituzione di tessuti duri, quali ossa e denti, in forza delle loro ottime proprietà meccaniche. Presentano, infatti, un elevato modulo elastico (nell'ordine dei GPa) e un'elevata resistenza allo snervamento, che ne rendono possibile l'impiego

in dispositivi in grado di sopportare carichi elevati senza eccessive deformazioni. Sono, inoltre, caratterizzati da una buona duttilità, che permette di evitare la rottura fragile nel caso in cui venga superato il limite di snervamento e quindi di intervenire, sostituendo il componente, prima della completa rottura. Infine, la loro elevata resistenza alla fatica meccanica li rende indicati per tutte quelle applicazioni che prevedono cicli di carico. Il principale svantaggio connesso al loro impiego è invece dato dalla loro intrinsecamente scarsa biocompatibilità. La valutazione della biocompatibilità dei metalli è legata alla loro tendenza, più o meno spiccata, a corrodersi in ambiente biologico. Infatti questi, in seguito all'impianto, risultano particolarmente soggetti al fenomeno della corrosione da parte dei fluidi biologici, che comporta il rilascio di ioni metallici, dannosi per l'organismo se si supera la dose di tossicità; questo fenomeno, inoltre, compromette la funzionalità del dispositivo stesso in quanto ne deteriora le proprietà meccaniche. Per ottenere migliori prestazioni, in genere, i biomateriali metallici si adoperano sotto forma di leghe, nelle quali, ad esempio, vengono previsti alcuni elementi, come cromo o molibdeno, in grado di aumentarne sensibilmente la resistenza alla corrosione tramite la creazione di uno strato di passivazione superficiale a base di ossido. Attualmente, il titanio (Ti) e le sue leghe sono i biomateriali metallici che più frequentemente vengono adoperati in campo clinico, grazie soprattutto alle loro buone caratteristiche di biocompatibilità, determinate appunto da un'elevata resistenza alla corrosione.

Ceramici. In base alla loro natura chimica, i ceramici sono definiti come materiali inorganici non metallici costituiti da composti di elementi metallici e semimetallici con non metalli, caratterizzati dalla presenza di legami forti, ionici o covalenti. Nonostante siano definiti come composti, si considera appartenente alla classe dei ceramici anche un elemento puro: il carbonio, nelle sue forme di diamante, grafite o carbonio pirolitico. Sulla base delle loro proprietà meccaniche possono, invece, essere definiti come tutti quei materiali inorganici non metallici caratterizzati da rottura fragile. I ceramici possono presentare struttura cristallina, mista (cioè costituita da una matrice vetrosa inglobante fasi cristalline) o totalmente amorfa. Una loro classificazione generale è quella che distingue i cosiddetti ceramici tradizionali dagli avanzati. Sono proprio alcuni ceramici avanzati (ossia quelli i cui costituenti si ricavano prevalentemente da ossidi puri, carburi, nitruri e siliciuri) ad aver recentemente trovato impiego come biomateriali, soprattutto nei settori odontoiatrico, ortopedico e cardiovascolare. La caratteristica peculiare dei ceramici, che ne ha principalmente determinato l'utilizzo in diverse applicazioni biomediche, è la loro inerzia chimica nei confronti dei fluidi biologici, grazie alla quale questi, in generale, risultano materiali altamente biocompatibili. Inoltre, la struttura atomica dei materiali ceramici, caratterizzata dalla presenza di ioni di segno opposto e legami forti, conferisce loro ottime proprietà di resistenza al calore, nonché di isolamento elettrico e termico. I ceramici presentano anche delle interessanti proprietà ottiche, per le quali alcuni risultano opachi, altri traslucidi o trasparenti. Dato che solitamente questi materiali si producono tramite tecniche di pressatura o sinterizzazione, sono poi caratterizzati da un'elevata resistenza ai carichi di compressione, mentre sono decisamente più danneggiabili se sottoposti a trazione. Sempre a causa della

loro struttura atomica, i ceramici presentano un comportamento meccanico assolutamente fragile: la presenza, nei loro reticoli cristallini, di costituenti polari alternati impedisce, infatti, lo scorrimento relativo dei piani atomici e causa quindi la rottura fragile del reticolo, quando sollecitato oltre un certo limite. Questi materiali presentano, inoltre, un'elevata durezza e rigidità; pertanto, il tipico diagramma sforzo-tensione di un ceramico prevede un andamento lineare molto ripido, con un ridotto valore di deformazione a rottura. Non essendo, quindi, materiali tenaci né duttili, risultano assolutamente inadeguati alla sopportazione di urti.

I ceramici avanzati, impiegati come biomateriali, si suddividono nelle seguenti categorie:

- ceramici bioinerti (o non riassorbibili); un materiale da impianto si dice bioinerte quando non induce né subisce alterazioni chimiche in seguito al contatto con l'ambiente biologico. Il ceramico bioinerte per eccellenza è l'allumina (ossido di alluminio), che costituisce infatti, per i ceramici, lo standard internazionale di bioinerzia.
- ceramici biodegradabili (o riassorbibili); l'organismo umano è in grado di metabolizzare questi materiali senza effetti nocivi. I ceramici biorassorbibili possono allora essere sfruttati per la realizzazione di dispositivi con mansioni temporanee.
- ceramici bioattivi (o attivi in superficie); si dicono bioattivi quei materiali in grado di favorire reazioni positive da parte dell'ambiente biologico in seguito all'impianto (come, ad esempio, la stimolazione dell'attività rigeneratrice dell'osso) e/o reazioni chimiche che modificano il materiale per un certo spessore sotto la sua superficie. A loro volta tra i ceramici bioattivi si distinguono gli intrinsecamente bioattivi, che favoriscono la bioattività grazie alla loro composizione chimica (tra questi troviamo le Bioceramiche, come l'idrossiapatite, e i Biovetri, come il Bioglass o il Cervital), e quelli in cui invece la bioattività è indotta o da trattamenti di superficie o a seguito del riempimento dei pori del materiale con sostanze farmacologicamente attive.

In generale, i biomateriali ceramici si utilizzano nella realizzazione dei dispositivi per la sostituzione funzionale di tessuti duri; in ambito ortopedico sono impiegati nello sviluppo di parti protesiche, in ambito odontoiatrico per produrre impianti dentali e come materiale per denti artificiali, in otorinolaringoiatria per la sostituzione degli ossicini dell'orecchio interno e nella chirurgia ricostruttiva di naso e gola ed, infine, in ambito cardiovascolare, alcuni ceramici risultano particolarmente adatti a realizzare protesi valvolari cardiache.

Biologici. Sono materiali di origine sia animale che umana, prevalentemente tessuti, il cui impiego come biomateriali è possibile solo previa devitalizzazione, cioè in seguito all'eliminazione delle tracce cellulari responsabili della vitalità del tessuto. Per i materiali biologici costituiti da tessuti molli l'utilizzo principale lo si ha in ambito cardiovascolare, in particolare per la realizzazione di protesi valvolari e di vasi sanguigni; i tessuti duri, invece, sono utilizzati soprattutto in ambito ortopedico, come riempimenti di cavità

dovute a difetti ossei o ad asportazioni di tumori. I tessuti connettivi, dunque ossa, cartilagini, sangue, endoteli e linfa, sono la classe di materiali biologici di maggiore interesse. Uno dei materiali biologici più sfruttato per la realizzazione di dispositivi medici è infatti il collagene.

Le maggiori limitazioni legate all'uso di questi biomateriali sono la loro tendenza alla calcificazione, cioè all'accumulo di calcio che nel tempo irrigidisce inevitabilmente il tessuto, ed il fatto che questi risultano spesso troppo costosi da isolare, estrarre e purificare. D'altra parte offrono, però, una bassa incidenza di tossicità e infiammazione rispetto ai materiali sintetici.

Compositi. Sono materiali formati da due o più fasi, quindi in generale da componenti chimici differenti, con un grado di dispersione maggiore di quello atomico. Le singole fasi che formano un composito sono chiamate costituenti e, a seconda della loro funzione, prendono il nome di matrice o rinforzo. La fase preponderante costituisce la matrice e in questa sono disperse una o più fasi differenti che fungono, appunto, da rinforzo, il quale in genere si presenta sottoforma particellare o fibrosa. Le proprietà complessive del composito differiscono, a volte anche considerevolmente, da quelle dei singoli costituenti che, agendo in sinergia disomogenea ed asimmetrica, conferiscono carattere anisotropo alle proprietà del materiale risultante.

La matrice del composito è costituita da una fase continua ed omogenea che ha il compito di racchiudere il rinforzo, garantendo la coesione del materiale e degli strati da cui esso può essere costituito (nel caso di composito laminato); la matrice ha inoltre la funzione di determinare il giusto grado di dispersione del rinforzo, evitando cioè zone di segregazione. L'inserimento del rinforzo nella matrice, come fase dispersa, ha lo scopo di migliorare una o più specifiche proprietà del composito. Solitamente si inserisce il rinforzo per assicurare una maggiore rigidità e resistenza meccanica rispetto a quelle offerte dalla sola matrice. Questo avviene, ad esempio, nel polietilene rinforzato con fibre di carbonio e nei polimeri di acido lattico rinforzati con particelle di idrossiapatite, entrambi utilizzati per curare fratture ossee. L'applicazione dei materiali compositi è, infatti, rivolta prevalentemente al settore ortopedico, dove sono necessari materiali adatti alla sostituzione di tessuti dalle elevate proprietà meccaniche, quali i legamenti del ginocchio, i tendini dell'osso o dell'anca. In generale, i materiali compositi offrono numerosi vantaggi in quanto le loro proprietà possono essere facilmente modulate per esaltare quelle di maggiore interesse in relazione alla specifica applicazione.

L'ultima classe di biomateriali, secondo la classificazione in esame, è quella dei materiali polimerici, che verrà approfondita più dettagliatamente nel seguente paragrafo.

1.2 Materiali Polimerici

1.2.1 Definizione e classificazione

Con il termine polimeri si designano tutti i composti organici le cui molecole derivano dall'unione, mediante legame chimico omopolare, di due o più unità strutturali a basso peso molecolare, dette monomeri. Il processo attraverso cui i vari monomeri si combinano tra loro per giungere alla formazione di nuove molecole di polimero è detto reazione di polimerizzazione.

È possibile distinguere una classe di polimeri naturali e una di polimeri sintetici; tra i primi troviamo ad esempio le proteine, i poliisopreni (ossia le gomme naturali), i polisaccaridi (come amido e cellulosa) e gli acidi polinucleici (dna e rna). I polimeri sintetici sono invece materiali di origine artificiale, sintetizzati tramite reazioni di polimerizzazione controllata.

In base al numero di monomeri che compongono le molecole di polimero, queste possono essere distinte in dimeri, trimeri, tetrameri, ecc. (quando coinvolgono rispettivamente due, tre, quattro o più monomeri).

Non esiste, infatti, un metodo soddisfacente per determinare il valore minimo di unità strutturali (i monomeri) che devono essere presenti in una molecola prima che questa possa essere classificata come polimero, in quanto queste variano notevolmente in peso e dimensioni molecolari; inoltre, la transizione delle proprietà da non polimeriche a polimeriche è un processo che avviene gradualmente all'aumentare del peso molecolare. Si definiscono, tuttavia, oligomeri le molecole con peso molecolare non superiore a 1500 g/mol, da 1500 a 5000 si parla di polimeri a basso peso molecolare, da 10000 in poi si parla di polimeri ad elevato peso molecolare.

I polimeri possono essere classificati anche in base alla natura chimica dei monomeri che li costituiscono. A tal proposito si distinguono gli omopolimeri, ossia polimeri le cui molecole sono formate esclusivamente dalla ripetizione della stessa unità monomerica, e i copolimeri, in cui sono invece presenti monomeri di diverso tipo. Le proprietà dei copolimeri non dipendono solo dalle differenti specie monomeriche coinvolte e dai loro rapporti quantitativi, ma anche dalla loro disposizione all'interno delle macromolecole.

Struttura, peso molecolare, grado di cristallinità, modalità di polimerizzazione, effetti della degradazione, caratteristiche termiche e procedure di lavorazione sono i parametri che contribuiscono a determinare, in maggior misura, le proprietà di un generico polimero e quindi a privilegiarne certe applicazioni piuttosto che altre.

1.2.2 Struttura

L'orientazione tridimensionale delle molecole del polimero è una delle caratteristiche che ne condiziona le proprietà. I polimeri sono materiali soggetti al fenomeno dell'isomeria strutturale o stereoisomeria, ossia, a

fronte della medesima composizione chimica, e quindi formula bruta, possono presentare una configurazione spaziale differente, e di conseguenza proprietà chimiche differenti, in quanto al variare della struttura variano i legami presenti tra le molecole.

Le moderne tecniche di sintesi dei polimeri consentono ad oggi un notevole controllo sulla produzione delle varie alternative strutturali, consentendo così di ottenere:

- polimeri lineari; sono articolati in un groviglio di lunghe macromolecole filiformi, la cui linearità è imputabile alla successione in un'unica direzione delle unità strutturali costituenti. Le unità monomeriche sono cioè organizzate in lunghe strutture filiformi, ognuna indipendente dalle altre, tenute insieme da legami deboli come forze di Van der Waals, legami ad idrogeno e interazioni dipolo-dipolo (come già detto, invece, i legami tra monomeri sono sempre e solo di natura covalente).



Fig. 1.1 Struttura macromolecolare dei polimeri lineari.

- polimeri ramificati; la struttura del polimero ramificato prevede una catena lineare centrale da cui si dipartono catene laterali più o meno lunghe. Con la presenza delle ramificazioni si riduce la capacità di impacchettamento della struttura, per cui la densità del polimero tende a diminuire. Anche in questo caso, le catene ramificate sono tenute insieme da interazioni deboli.

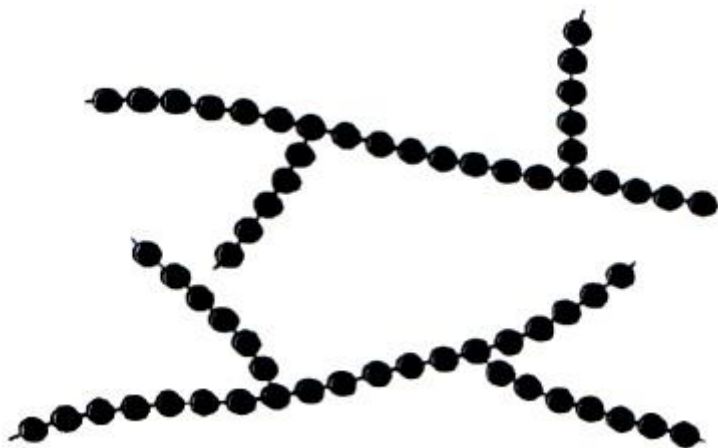


Fig. 1.2 Struttura macromolecolare dei polimeri ramificati

- polimeri a legami incrociati; in questa struttura le catene lineari adiacenti sono tenute insieme da legami covalenti. In tal caso, cioè, le ramificazioni laterali si dipartono da certe catene e si concludono in altre, agganciandole tra loro. Questa particolare struttura macromolecolare la si può ottenere sia in fase di sintesi, sia con una successiva reazione chimica non reversibile, condotta ad elevata temperatura.

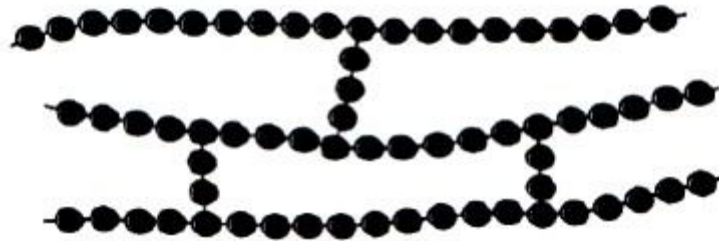


Fig. 1.3 Struttura macromolecolare dei polimeri a legami incrociati.

- polimeri reticolati; in questo caso, le unità monomeriche trifunzionali presentano tre legami covalenti attivi con altrettanti monomeri adiacenti. Nel complesso si determinano così delle reti tridimensionali di unità strutturali. Questa quarta classe comprende, quindi, tutti i polimeri che si presentano come un'unica grande macromolecola reticolata, costituita dalle diverse macromolecole unite tra loro. Polimeri con questa particolare struttura hanno proprietà meccaniche e termiche peculiari.



Fig. 1.4 struttura macromolecolare dei polimeri reticolati.

Come anticipato, la struttura spaziale del polimero ne influenza diverse proprietà: in particolare, a causa del fatto che nei polimeri lineari e ramificati i legami sono di tipo debole, questi risultano meno rigidi di quelli a struttura reticolata o a legami incrociati. Inoltre, questi presentano un comportamento più spiccatamente viscoelastico, in quanto i legami deboli permettono alle catene di scorrere progressivamente le une sulle altre. Ciò, al contrario, non accade con i polimeri a struttura reticolata o a legami incrociati, dove le

interazioni tra monomeri sono di natura covalente; questi presentano, infatti, anche una maggiore resistenza alle sollecitazioni meccaniche. Dunque, in generale, i polimeri a catena lineare e ramificata hanno proprietà meccaniche inferiori a quelli a catena reticolata; va comunque sottolineato che la conformazione ramificata gode di proprietà meccaniche migliori rispetto a quella lineare, dal momento che la prima, a causa degli impedimenti fisici intrinseci alla sua struttura, presenta una maggiore resistenza allo scorrimento.

1.2.3 Grado di polimerizzazione e peso molecolare

Prima di approfondire le proprietà caratteristiche dei polimeri, è utile mettere in evidenza due parametri fondamentali per la caratterizzazione di questi materiali: il grado di polimerizzazione ed il peso molecolare. Quest'ultimo, in particolare, determina infatti il valore di molte proprietà fisiche e meccaniche del polimero. Consideriamo ad esempio la resistenza alla trazione di un generico polimero. A bassi pesi molecolari questa risulta così scarsa da rendere il polimero inadatto ad una qualsiasi applicazione commerciale; tende invece a migliorare all'aumentare del peso molecolare (figura 1.5). Molte altre proprietà meccaniche hanno un simile andamento, ovvero presentano un valore ridotto per bassi pesi molecolari e saturano per pesi molecolari molto elevati.

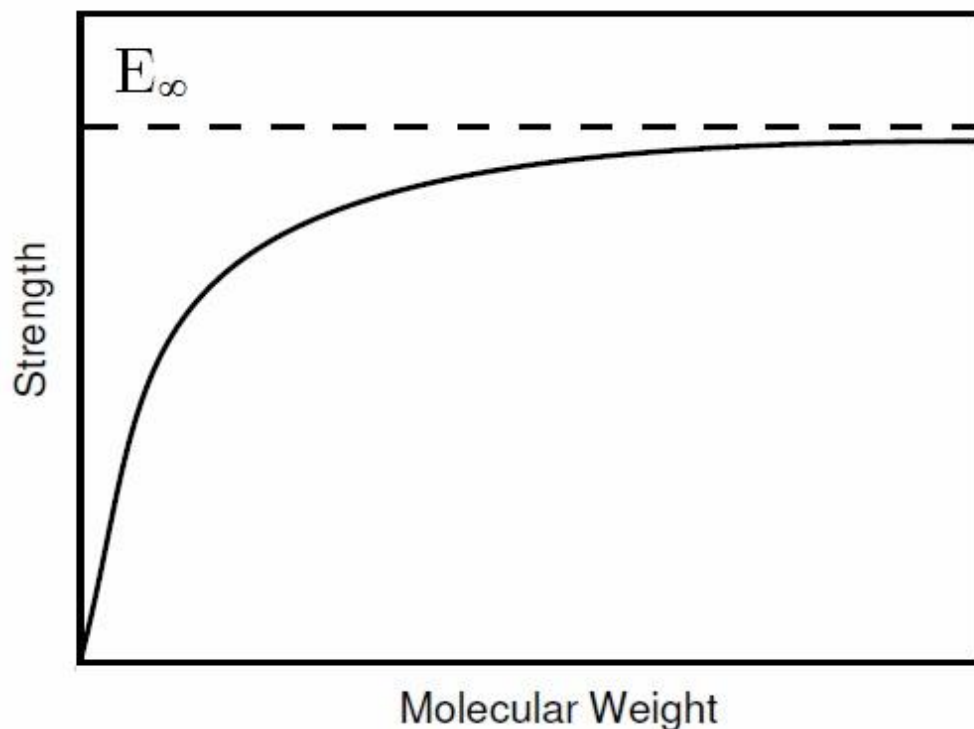


Fig. 1.5 Andamento della resistenza a trazione in funzione del peso molecolare.

Il grado di polimerizzazione di una molecola di polimero è definito come il numero di molecole di monomero unite a formare la molecola di polimero. Il peso molecolare di una molecola di polimero è dato dal peso molecolare di una molecola di monomero moltiplicato per il numero di monomeri presenti nella molecola di polimero, cioè moltiplicato per il grado di polimerizzazione.

A seguito della complessità dei meccanismi coinvolti nelle reazioni di polimerizzazione, la massa di polimero risultante contiene di solito più di una macromolecola e il grado di polimerizzazione (quindi, di conseguenza, il peso molecolare) non risulta lo stesso per ciascuna di queste. Dunque, nel caso dei polimeri, composti in genere da più macromolecole, non si definisce un unico valore di peso molecolare, come avviene per le piccole molecole, ma una distribuzione statistica di peso molecolare. È utile, allora, riferirsi al grado medio di polimerizzazione e al peso molecolare medio. Il grado medio di polimerizzazione si ottiene dividendo il numero totale di molecole di monomero presenti nel polimero per il numero totale delle macromolecole che lo compongono; il peso molecolare medio si ottiene invece dividendo il peso totale del polimero per il numero delle sue macromolecole. Per l'esattezza, quest'ultima definizione corrisponde al calcolo del cosiddetto peso molecolare medio numerale:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

dove $\sum N_i$ indica il numero totale delle macromolecole che compongono il polimero, di peso molecolare rispettivamente pari a M_i . La sommatoria $\sum N_i M_i$ corrisponde allora al peso totale del polimero.

Si può definire anche il peso molecolare medio ponderale, con cui si tiene conto del fatto che le molecole più lunghe hanno un maggior peso sulla quantità di massa totale; questo è dato da:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum W_i M_i}{\sum W_i} = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

dove W_i indica il peso complessivo di tutte le macromolecole di peso molecolare M_i .

Per come definiti i due pesi molecolari medi, per uno stesso polimero, quello ponderale risulta maggiore del numerale. A partire da questi, si definisce poi un altro parametro caratteristico di ciascun polimero, l'indice di polidispersità (o del grado di dispersione), dato dal rapporto:

$$D = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$$

Questo parametro è adottato come indice pratico della larghezza della distribuzione dei pesi molecolari. Nel caso particolare in cui risulti $\bar{M}_n = \bar{M}_w$, cioè $D=1$, si ha che il polimero è costituito da macromolecole aventi tutte lo stesso peso molecolare e pertanto viene detto monodisperso. Sebbene il limite teorico inferiore previsto per l'indice D sia appunto 1, gli esiti sperimentali nell'ambito dei polimeri sintetici mostrano che molto raramente si ottengono valori inferiori a 1,1; solitamente il valore dell'indice di polidispersità si assesta tra 1,5 e 2,5.

Poiché la polimerizzazione non è mai completa, la percentuale di monomero residuo ha un marcato effetto sul peso molecolare e quindi sulle proprietà fisiche, dato che queste dipendono fortemente

dall'ammontare delle macromolecole a basso, medio ed alto peso molecolare. Nelle applicazioni biomediche, peso molecolare elevato e ridotto indice di polidispersità, garanti di buone proprietà meccaniche e bassa dispersione della distribuzione dei pesi molecolari, costituiscono, unitamente all'assenza di monomero residuo potenzialmente tossico, requisiti molto importanti.

1.2.4 Cristallinità e amorfismo

Il grado di cristallinità è un altro parametro caratteristico dei materiali polimerici. Questi, in generale, sono infatti identificabili come strutture a due fasi, l'una amorfa e l'altra cristallina.

Un materiale, o una sua porzione, si trova allo stato cristallino quando presenta una disposizione geometricamente ordinata degli atomi costituenti. In questo caso è possibile individuare, a livello atomico, la cosiddetta cella elementare, ossia il minimo motivo tridimensionale, caratterizzato da una certa geometria (più o meno regolare), che, traslato nelle tre direzioni dello spazio, ricrea esattamente il reticolo cristallino.

Si definisce, allora, grado di cristallinità il rapporto percentuale del peso di sostanza allo stato cristallino rispetto al peso totale.

Nessun polimero è completamente cristallino: lo stato amorfo, seppure in percentuali variabili (più elevate in corrispondenza di strutture ramificate o reticolate), risulta sempre presente ed è indicativo del mantenimento, da parte del polimero allo stato solido, della struttura completamente disordinata caratteristica dello stato fuso.

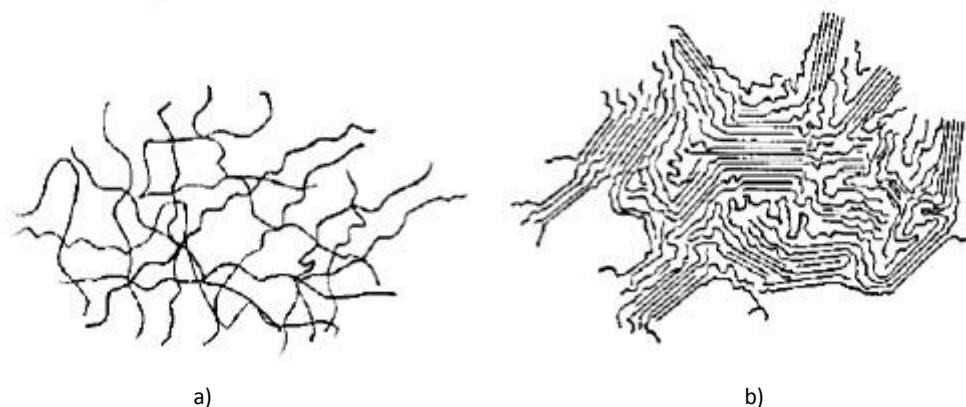


Fig. 1.6 a) polimero a struttura completamente amorfa; b) polimero con fase amorfa e fase cristallina.

In generale, la componente cristallina è caratterizzata da una ridotta estensione spaziale, cioè dal coinvolgimento di un numero limitato di catene; questa risulta più abbondante nei polimeri a struttura lineare e chimicamente omogenea. La presenza di ramificazioni o legami trasversali riduce, infatti, la capacità di impacchettamento delle catene, ostacolandone l'allineamento. Un altro fattore che regola la possibilità di formare zone cristalline è la natura chimica dei costituenti, in particolare la presenza di certi elementi o gruppi funzionali. Alcuni di questi determinano, infatti, la formazione, tramite forze a corto

raggio, di legami tra catene, grazie ai quali queste iniziano ad attrarsi reciprocamente e a disporsi così in forma distesa, favorendo nel complesso la formazione di zone cristalline. Anche i processi di lavorazione subiti dal polimero ne influenzano il grado di cristallinità finale: alcune lavorazioni, come l'estrusione, tendono ad allineare meccanicamente le catene polimeriche, favorendo la formazione di zone allo stato cristallino.

Il grado di cristallinità, dipendente dalla storia termica e meccanica della sostanza e valutabile per mezzo di misure di densità, diagramma di diffrazione ai raggi X, spettro infrarosso e misure calorimetriche, assume, quindi, valori molto bassi per quanto concerne il maggior numero dei casi, in particolar modo se si tratta di polimeri caratterizzati da strutture ramificate o reticolate, con presenza di monomeri asimmetrici, mentre può raggiungere percentuali considerevoli in presenza di strutture lineari.

In generale, un maggior impacchettamento delle macromolecole, dunque un più elevato grado di cristallinità, comporta numerosi vantaggi, quali un incremento di densità, rigidità e durezza, minor attrito, maggiore resistenza all'usura, all'aggressione ambientale ed al fenomeno viscoelastico del creep.

1.2.5 Proprietà termomeccaniche

In base alle loro proprietà termomeccaniche i materiali polimerici possono essere suddivisi in due categorie: termoplastici e termoindurenti.

Si dicono termoplastici i polimeri a struttura lineare o ramificata, tra le cui macromolecole si ha, quindi, la sola presenza di legami secondari, aventi bassa resistenza termica e che reagiscono ad un graduale incremento di temperatura diminuendo la loro viscosità e andando incontro ad un progressivo rammollimento. Rimanendo in opportuni intervalli di temperatura, è quindi possibile rimodellarli plasticamente per un numero pressoché illimitato di volte, senza che il polimero si degradi o alteri le sue proprietà.

I termoindurenti, invece, sono in genere polimeri a struttura reticolata e hanno la caratteristica di non poter esser fusi, una volta prodotti, senza incorrere nella loro degradazione chimica. In tal caso, la somministrazione di calore induce un iniziale rammollimento, che consente la formatura, cui segue però il completamento della polimerizzazione iniziata in fase industriale. L'elevata reticolazione che così si raggiunge implica un irreversibile incremento della durezza e della rigidità della sostanza, che ne impedisce un'eventuale rimodellamento.

Generalmente, i termoindurenti presentano migliori caratteristiche meccaniche rispetto ai termoplastici, a causa dell'intenso cross-linking tridimensionale, e resistono meglio alle elevate temperature.

Per la gran parte delle applicazioni è necessario che un materiale polimerico risulti stabile in specifiche condizioni di temperatura. Il range di temperatura corrispondente alla stabilità chimica del materiale può essere individuato in diversi modi, in particolare mediante l'impiego della termogravimetria. Tale tecnica

consiste nella determinazione delle variazioni di peso del campione quando questo è sottoposto ad un riscaldamento controllato. Nel caso dei polimeri, infatti, l'aumento di temperatura provoca delle modificazioni chimiche, come la scissione di legami, spesso accompagnata dalla formazione di prodotti volatili, con conseguenti alterazioni delle proprietà. In relazione all'applicazione del materiale in dispositivi medici, si rende necessario valutare la stabilità termica del biomateriale polimerico a temperature superiori a quella ambiente (la temperatura di esercizio di un dispositivo impiantabile è infatti la temperatura corporea, che varia tra 35 °C e 41 °C).

Il comportamento meccanico dei polimeri risulta fortemente dipendente dalle condizioni termiche. L'aumento di temperatura provoca, infatti, alterazioni chimiche dovute alla rottura dei legami e possibile rilascio di sostanze volatili, dunque un'alterazione delle proprietà fisiche del materiale. Ciò può essere messo ben in evidenza dall'analisi dell'andamento del modulo elastico in funzione della temperatura, riportato nel grafico (figura 1.7). Su tale grafico è possibile individuare le temperature caratteristiche delle tre tipologie di materiale polimerico considerate: un polimero amorfo lineare, uno semicristallino e un polimero reticolato (termoindurente). Per i primi due si osserva, all'aumentare della temperatura, una prima riduzione del modulo elastico, in corrispondenza dell'intorno della cosiddetta temperatura di transizione vetrosa, T_g . Questa è la temperatura alla quale il polimero subisce una particolare trasformazione, detta appunto transizione vetrosa. Macroscopicamente questa si manifesta attraverso drastici cambiamenti di molte proprietà fisiche: in corrispondenza della T_g si ha, infatti, il passaggio da un solido relativamente fragile e rigido (al di sotto della T_g) ad una gomma o un liquido viscoso (superata la T_g), estremamente più duttile e tenace. A livello molecolare la transizione vetrosa è dovuta a moti cooperativi che coinvolgono lunghi segmenti delle catene monomeriche: si tratta specificamente di moti conformazionali che si generano per rotazione delle catene attorno ai legami singoli che connettono gli atomi. Questo è un processo tipico della sostanza amorfa, sempre presente nei materiali polimerici. Ne risentono, pertanto, in maniera più accentuata quei polimeri in cui la componente amorfa prevale notevolmente sulla cristallina, specialmente se a struttura lineare. Ovviamente anche i polimeri semicristallini, in corrispondenza di questa temperatura, subiscono un decremento delle loro proprietà meccaniche, benché di minore entità, essendo in questi limitata la componente allo stato amorfo. Come risulta evidente dal grafico sotto riportato, sono invece pressoché insensibili al fenomeno della transizione vetrosa i polimeri a struttura reticolata. In ogni caso, la temperatura di transizione vetrosa costituisce un parametro particolarmente interessante dal punto di vista tecnologico e applicativo per la maggior parte dei materiali polimerici: è infatti il suo valore, rispetto a quello della temperatura di esercizio, a determinare il comportamento meccanico del polimero e quindi la sua funzionalità in un certo dispositivo. A seconda delle proprietà meccaniche richieste occorrerà, dunque, conoscere lo stato del materiale alle temperature di esercizio. In particolare, nel caso dei biomateriali polimerici da impianto, è necessario determinare se il valore della T_g risulta superiore o inferiore alla temperatura corporea. La temperatura di

transizione vetrosa varia notevolmente da polimero a polimero, in relazione al grado di cristallinità e alla struttura; questa, per uno stesso polimero, risulta inoltre dipendente dal grado di polimerizzazione. Altre temperature notevoli, evidenziate nel grafico, sono la temperatura di fusione e quella di rammollimento. Entrambe rappresentano la temperatura media del range termico corrispondente al passaggio di stato da solido a liquido. Si parla di temperatura di fusione (T_m) quando il materiale allo stato solido si presenta, almeno parzialmente, in forma cristallina; infatti un polimero semicristallino, come risulta evidente nel grafico in esame, è caratterizzato da un'accentuata riduzione del modulo elastico proprio in corrispondenza della T_m , alla quale avviene lo sfaldamento del reticolo cristallino, mentre, come detto, le sue proprietà meccaniche risentono meno della transizione vetrosa. Quando invece il polimero allo stato solido è amorfo, la soglia termica alla quale si concretizza il passaggio dallo stato gommoso a quello liquido si indica come temperatura di rammollimento (T_r). I polimeri amorfi presentano quindi una seconda brusca riduzione delle loro proprietà meccaniche nell'intorno della T_r , paragonabile a quella che subiscono in corrispondenza della transizione vetrosa. Infine, per tutte le sostanze polimeriche, può essere individuata una temperatura detta di stabilità chimica (T_l), che rappresenta la massima temperatura oltre la quale si ha la completa rottura dei legami chimici: in corrispondenza della T_l il materiale perde, quindi, la sua struttura ed ogni caratterizzazione meccanica. Nel caso del polimero a struttura reticolata risulta difficile individuare valori esatti per la temperatura di transizione vetrosa e per quella di fusione, dato che le sue proprietà rimangono praticamente costanti all'interno del range di stabilità (c'è in realtà una lieve diminuzione), oltre al quale il modulo elastico si annulla.

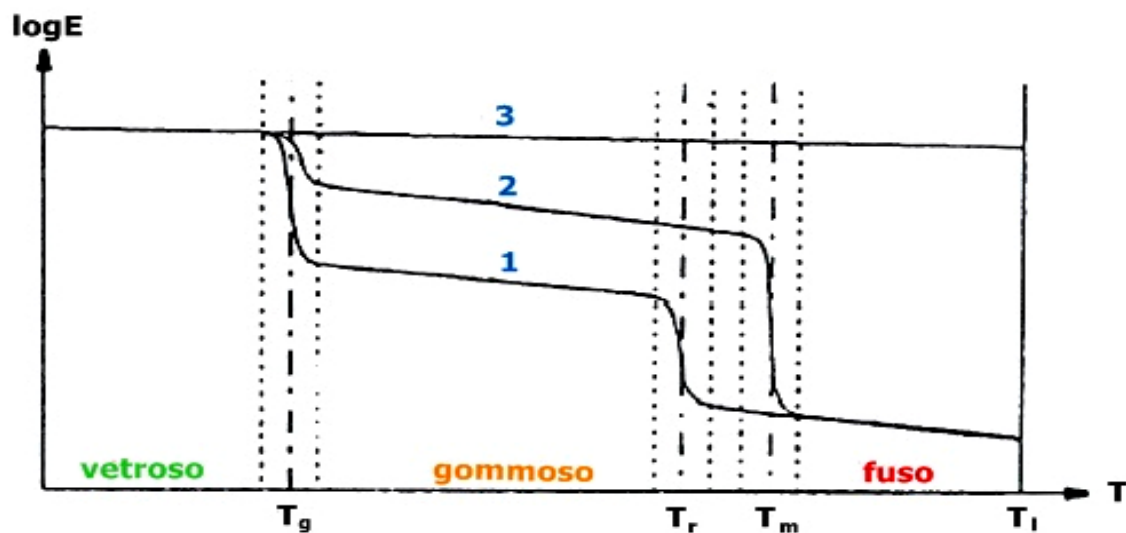


Fig. 1.7 Andamento del modulo elastico (E) in funzione della temperatura, per polimeri a differente struttura:

1-amorfo; 2-semicristallina; 3-reticolata.

1.2.6 Materiali polimerici per uso biomedico

Circa il 45% dei biomateriali attualmente in uso appartiene alla famiglia dei polimeri, che sono quindi i materiali più impiegati nella realizzazione di dispositivi medici.

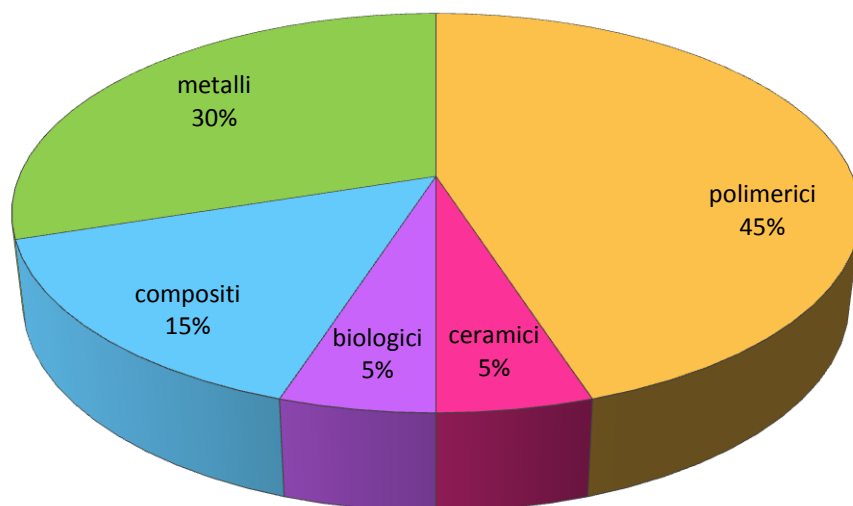


Fig. 1.8 Utilizzo, in percentuale, delle diverse classi di biomateriali.

Le vastissime applicazioni dei materiali polimerici nel settore biomedicale sono dovute a diverse loro caratteristiche interessanti. Uno dei punti di forza alla base del loro largo impiego come biomateriali è il fatto che i polimeri sintetici presentano una struttura chimica molto simile a quella dei polimeri naturali contenuti nei tessuti biologici, quali principalmente il collagene, e in alcuni casi è quindi possibile ottenere dei legami chimici tra le catene dei polimeri naturali e quelle dei polimeri sintetici; in questo senso, i materiali polimerici possono distinguersi per un'elevata biocompatibilità, caratteristica cruciale in questo ambito applicativo. Talvolta l'interazione con l'organismo può, invece, condurre ad una sorta di metabolizzazione del polimero, che nel tempo viene degradato e successivamente eliminato; questi polimeri bioassorbibili vengono impiegati per la realizzazione di dispositivi con mansioni temporanee.

Oltre a questo, i principali vantaggi correlati all'utilizzo di biomateriali polimerici sono la loro notevole variabilità in composizione, tale da decretarne, di volta in volta, proprietà fisico-meccaniche idonee alla destinazione d'uso prevista; i bassi coefficienti d'attrito, quindi una buona resistenza all'usura; la facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse, quali fibre, trame, pellicole e barre; la possibilità di apportare modifiche superficiali di natura chimico-fisica senza alterare le masse interne, così come la possibilità di costruire con essi capsule o superfici operanti quali vettori di cellule e biomolecole.

Le proprietà sopra elencate sono identificative della struttura molecolare del polimero, nonché dei processi chimico-fisici cui è stato sottoposto, e pertanto caratterizzano gli attributi ultimi del dispositivo creato.

D'altra parte le principali limitazioni legate all'utilizzo di materiali polimerici in applicazioni biomedicali sono il possibile rilascio di sostanze tossiche nell'organismo, la facilità di assorbimento di acqua e biomolecole dall'ambiente circostante, anche quando non richiesto, e le scarse proprietà meccaniche, peraltro facilmente alterabili da processi di sterilizzazione.

Nonostante gli svantaggi citati, allo stato attuale i materiali polimerici sono adottati nella produzione di numerosissimi dispositivi, tra cui placche, viti, chiodi e tutte le strutture bioassorbibili, strumenti per il controllo dei fluidi corporei, valvole cardiache, protesi vascolari, organi bioartificiali, rivestimenti per sensori, per dispositivi elettronici impiantabili e per lenti a contatto ed intraoculari, oltre che nell'ambito della rigenerazione tissutale.

Data l'intensa e crescente attività di ricerca sui polimeri, portata avanti sia accademicamente che industrialmente per applicazioni biomedicali, risulta complesso identificare esattamente il numero di diversi sistemi polimerici messi a punto in questo settore. Possono comunque essere identificate due grandi categorie: quella dei polimeri di origine naturale e quella dei polimeri sintetici.

Per quanto riguarda i primi, quelli che rivestono un ruolo di maggiore importanza sono:

- polisaccaridi; presenti negli organismi animali con funzione energetica, costituiscono una delle maggiori componenti dei tessuti vegetali (la cellulosa, ad esempio, rappresenta il principale costituente del tessuto fibroso delle pareti cellulari vegetali). Risultano materiali molto interessanti in campo biomedico in quanto biodegradabili e caratterizzati da facile lavorabilità;
- chitina; è uno dei principali componenti dell'esoscheletro di insetti e alcuni artropodi e della parete cellulare di funghi e batteri. Un suo derivato, il chitosano, presenta un'alta biocompatibilità *in vivo*, ed è considerato un potenziale materiale da impiegare nella realizzazione di *scaffolds* per la ricostruzione di ossa, cartilagini e pelle;
- proteine come collagene (la più importante del corpo umano, presente, con funzione di sostegno, in pelle, tendini, vasi sanguigni, ossa, membrane cellulari), fibrina (derivante dal fibrinogeno, svolge un ruolo fondamentale nella coagulazione sanguigna), gelatina (ottenuta dai tessuti connettivi animali) e albumina (proteina del plasma, contenuta anche nel latte e nell'albume dell'uovo) vengono utilizzate in ingegneria tissutale per la ricostruzione sia di ossa che di tessuti molli. Questo è possibile grazie alla loro elevata biocompatibilità e alla possibilità di crescita cellulare sulle loro superfici, anche se la difficile lavorabilità e la diversa velocità di degradazione, variabile da paziente a paziente, costituiscono dei limiti al loro impiego.

La categoria dei polimeri sintetici comprende numerosi materiali. Fra questi, i poliesteri alifatici, che verranno ampiamente trattati nel seguito, sono sicuramente la classe più studiata in riferimento ai materiali biodegradabili, grazie all'elevata biocompatibilità e alla relativa semplicità di sintesi che li caratterizza. Gli altri polimeri sintetici utilizzati come biomateriali sono:

- polianidridi; idroliticamente instabili, in ambiente biologico si degradano nel giro di qualche giorno o qualche settimana se alifatiche, mentre se aromatiche i tempi si allungano fino a raggiungere molti mesi o addirittura anni. Per questa ragione costituiscono uno dei materiali più studiati nell'ambito del *drug release*.
- policarbonati alifatici; si distinguono principalmente per la loro struttura molecolare estremamente ordinata e cristallina. Questa caratteristica li rende particolarmente tenaci e resistenti ad azioni meccaniche come il graffio, la perforazione e l'abrasione; inoltre, la possibilità di sterilizzarli in autoclave ne ha permesso l'impiego per la fabbricazione di strumenti cardiocirurgici e per dialisi;
- poli(ammidi); sono polimeri caratterizzati da legami molto stabili idroliticamente, che vengono erosi solo in presenza di enzimi. Rappresentano una classe di materiali molto interessante, data la possibilità di modularne le sequenze di amminoacidi, anche se il loro utilizzo risulta limitato dalla non ottimale biocompatibilità;
- poli(ortoesteri); si tratta di polimeri amorfi e idrofobi, adatti alla realizzazione di matrici per il rilascio controllato di farmaci in quanto si degradano solo superficialmente e tendono a diventare sottili, senza però sgretolarsi; non si sono invece rivelati ideali per altri tipi di applicazioni, data la loro elevata velocità di degradazione.

Tabella 1.1 Principali polimeri sintetici per uso biomedico e relative applicazioni.

Polimero	Sigla	Principali applicazioni
Acido Poliglicolico	PGA	Strutture biodegradabili, placche e chiodi intramidollari, placche di frattura biodegradabili
Acido Polilattico	PLA	Placche e chiodi intramidollari, legamenti artificiali, placche di frattura biodegradabili, somministrazione controllata di farmaci
Copolimeri Butadiene-Stirene	BS	Articoli monouso e imballaggi
Copolimeri Stirene-Acrilonitrile	SAN	Aspiratori per sangue, componenti di emodializzatori
Poliacrilonitrile	PAN	Membrane per emodialisi
Poliammidi	-	Suture
Policarbonato	PC	Membrane per ossigenatori ed emodialisi, linee ematiche
Polidrossietilmetacrilato	PHEMA	Lenti a contatto, legamenti artificiali
Polietilene	PE	Film, imballaggi, cateteri, tubi, connettori, somministrazione controllata di farmaci
Polietilene ad elevato peso molecolare (PM>2000000)	UHMWPE	Superfici articolari, fibre per compositi, placche ortopediche, rivestimenti per steli femorali

Polietilentereftalato	PET	Protesi vascolari, anelli di sutura, suture, passaggi transcutanei, componenti di protesi valvolari, componenti di assistenza cardiaca
Polimetimetacrilato	PMMA	Cemento osseo, lenti a contatto e intraoculari, membrane per emodialisi, materiali dentari
Polipropilene	PP	Imballaggi sterili, siringhe, connettori, membrane per ossigenatori
Polisolfone	PSU	Membrane per ossigenatori ed emodialisi
Politetrafluoroetilene	PTFE	Protesi vascolari, componenti di protesi valvolari
Poliuretani	PURs	Cateteri, cannule, tubi endotracheali
Polivinilcloruro	PVC	Sacche per sangue, guanti monouso
Siliconi	-	Cateteri, drenaggi, pelle artificiale

1.3 Copolimeri

I copolimeri, come già accennato, sono quei polimeri derivanti dalla combinazione, in fase di sintesi, di diverse specie monomeriche. Tutti i copolimeri (e quindi anche i copoliesteri) sono composti connotati da proprietà chimico-fisiche altamente modulabili, in relazione al tipo, alla concentrazione e alla distribuzione relative delle unità comonomeriche lungo le catene polimeriche; ciò determina una notevole variabilità applicativa dei copolimeri. L'introduzione del secondo comonomero, la sua disposizione rispetto al primo, la sua concentrazione relativa, nonché la sua influenza sul processo di sintesi e sulla struttura copolimerica che ne deriva, sono, infatti, variabili condizionanti il meccanismo di reazione e quindi la conformazione e l'assetto delle macromolecole allo stato solido finale. La descrizione completa della struttura di un copolimero richiede la determinazione di diversi parametri, calcolabili sulla base di modelli cinetici o statistici, che consentono di descrivere i processi di concatenamento delle unità comonomeriche e la loro distribuzione nelle catene. Tali parametri sono:

- composizione, vale a dire la concentrazione relativa delle diverse specie monomeriche (indicate nel seguito con A e B), e distribuzione delle composizioni;
- tipologie delle unità ripetitive create nella catena dai due monomeri, valutate rispetto alle caratteristiche intrinseche del monomero (disposizioni testa-coda, creazione di strutture isomeriche nei monomeri polifunzionali o eventuali arrangiamenti);

- ordine di incorporazione di A rispetto a B, il quale determina l'insorgere di sequenze di diversa lunghezza, e le modalità con cui queste ultime si distribuiscono;
- pesi molecolari delle catene e loro distribuzione statistica, determinabili previa misura sperimentale delle costanti di velocità di accrescimento e terminazione;
- presenza di processi non controllati che diano origine a ramificazioni, ciclizzazioni o reticolazioni indesiderate.

In base alla distribuzione relativa delle due specie comonomeriche, i copolimeri sono classificabili in quattro diverse tipologie, connotate da difficoltà di sintesi, caratterizzazione e rilievo industriale eterogenei:

- copolimeri statistici o random, nei quali le diverse unità monomeriche assumono collocazioni casuali nella catena principale;



- copolimeri alternati, in cui le diverse specie monomeriche sono regolarmente alternate lungo la catena;



- copolimeri a blocchi (o a segmenti), formati da blocchi, più o meno lunghi, della stessa unità monomerica alteranti tra loro; in tal caso un parametro caratteristico del copolimero è proprio la lunghezza media dei blocchi.



- copolimeri ad innesto, in cui un solo tipo di monomero costituisce la catena principale, dalla quale si dipartono ramificazioni formate dall'altra co-unità.



Si approfondiscono, nel seguente paragrafo, i copolimeri a blocchi, quali saranno, infatti, i campioni sintetizzati nel presente lavoro di ricerca.

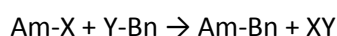
1.3.1 Copolimeri a blocchi

I copolimeri a blocchi detengono proprietà modulabili in un range che si estende da plastiche rigide ad elastomeri, per la combinazione della natura identificativa di entrambi gli omopolimeri. Il lavoro compiuto in questo settore dalla chimica macromolecolare durante gli ultimi decenni è stato formidabile. Le strutture copolimeriche a blocchi progettate sono, infatti, assai numerose:

- di-blocchi: Am-Bn. I blocchi possono contenere gruppi terminali o gruppi di giunzione ed il secondo blocco può includere un terzo monomero C (Am-B-C) con distribuzione casuale, alternata, ecc;
- tri-blocchi: Am-Bn-Am, Am-Bn-Aq, Am-Bn-Cq, semplificazioni di copolimeri contenenti tre blocchi distribuiti come da rappresentazione;
- multi-blocchi, copolimeri segmentati: Am-Bn-Am-Bq-Am-Bq;
- copolimeri a di-blocchi ripetuti: (Am-Bn) x;
- copolimeri a blocchi sovrapposti, o overlapped, Am-(Ax, By)-Bn;
- copolimeri a stella, con multibraccia collegate da un'unità di giunzione, considerabili come un caso particolare di copolimeri ad innesto.

I copolimeri a blocchi sono sintetizzabili mediante:

- creazione di centri attivi (radicalici, anionici, cationici) su di una catena polimerica la quale può successivamente indurre la polimerizzazione di un secondo monomero;
- condensazione tra gruppi funzionali terminali del polimero o prepolimero:



Ricorrendo all'uso di monomeri dienici, vinilici non polari, esteri, eteri o solfuri ciclici è possibile, seguendo la via delineata da M. Szwarc, sintetizzare copolimeri a sequenze ben definite e con pesi molecolari, struttura e composizione desiderate.

La produzione di copolimeri a blocchi con iniziatori anionici è conseguibile mediante:

- successiva polimerizzazione di monomeri;
- polimerizzazione del secondo monomero con un prepolimero funzionalizzato dal primo monomero;
- adozione di reazioni di accoppiamento tra terminali reagenti e un composto reattivo che diviene sito di giunzione;
- impiego di iniziatori bifunzionali.

Blocchi cristallizzabili e non cristallizzabili di sequenze A e B, costituenti i copolimeri, portano alla rispettiva formazione, in seguito a una segregazione/separazione di fase, di domini cristallini e microdomini amorfi. Il metodo di preparazione del campione, unitamente alle caratteristiche molecolari del copolimero a blocchi, determina la morfologia e quindi le transizioni termiche dei sistemi multifasici microsegregati così formati.

I copolimeri, in relazione alla natura cristallizzabile dei blocchi costituenti, sono pertanto distinguibili in:

- blocchi non cristallizzabili; nell'ipotesi teorica che la separazione di fase induca la formazione di microdomini nettamente distinti, ad ogni fase amorfa corrisponde una transizione vetrosa correlabile alla T_g del corrispondente omopolimero. La formazione di domini separati origina interazioni tra microfasi distinte, imputabili all'esigua estensione dei domini ed alla continuità della catena nell'interfaccia tra essi, responsabili di spostamenti e variazioni di intensità e ampiezza delle

transizioni termiche caratteristiche. In presenza di volume interfacciale cospicuo e di una vera e propria interfase, alla T_g delle due microfasi si affianca una transizione vetrosa, collocata a temperatura intermedia tra esse, che può divenire la principale transizione termica.

- blocchi cristallizzabili; i domini cristallini, generati dalla segregazione di fase, possono dar luogo a strutture organizzate con arrangiamento periodico o prive di organizzazione. Nell'eventualità in cui entrambi i blocchi siano cristallizzabili, il primo a cristallizzare genera le restrizioni steriche cui il secondo si adatta per il conseguimento della morfologia finale. In presenza di un solo blocco cristallizzabile (A), invece, se il componente amorfo (B) vetrifica prima della cristallizzazione di A, questa può risultare inibita. L'uso di solventi che solvatino selettivamente uno dei due blocchi condiziona la morfologia del copolimero finale. Poliuretani e poliesteri segmentati sono esempi di copolimeri a multi-blocchi che danno origine a microdomini cristallini dispersi in una fase amorfa, articolata in segmenti flessibili e in una frazione di componente rigido incapace di cristallizzare.

1.4 Poliesteri Alifatici

I poliesteri sono polimeri identificati dal ricorrere dell'unità funzionale esterea nella catena carboniosa, ottenuti principalmente per policondensazione di uno o più acidi organici polifunzionali con uno o più alcoli polifunzionali. In generale, i poliesteri trovano impiego come materie plastiche, ma anche come prodotto di base per la produzione di vernici e di fibre tessili: le caratteristiche meccaniche e le proprietà chimico-fisiche consentono, infatti, a questi polimeri un'ampia serie di applicazioni. Le prime sperimentazioni di sintesi di poliesteri risalgono ai primi anni dell'Ottocento, ma il loro debutto commerciale avvenne solo durante la Prima Guerra Mondiale, quando venne prodotto il Glyptal, una resina alchilica ottenuta da glicerina, anidride ftalica e acidi grassi, utilizzata come rivestimento e materiale impregnante.

In relazione ai monomeri di partenza, i poliesteri si distinguono in aromatici ed alifatici. La differenza principale tra questi è rappresentata dal fatto che nell'unità ripetitiva dei primi sono presenti uno o più anelli benzenici, mentre i secondi non presentano struttura aromatica.

I poliesteri alifatici costituiscono la classe di polimeri biodegradabili di maggior successo, importanza e diffusione commerciale in riferimento all'applicazione in campo biomedico, ad oggi ampliata rispetto al tradizionale impiego in suture chirurgiche.

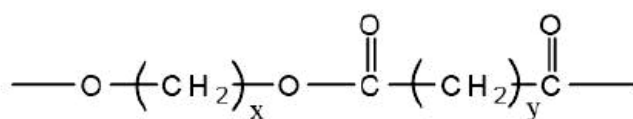


Fig. 1.9 Struttura chimica generica dei poliesteri alifatici lineari.

Attualmente, tale classe di materiali polimerici è la più intensamente studiata in termini di meccanismi di degradazione e relazioni struttura-proprietà.

In generale, lo sviluppo di nuovi materiali polimerici biodegradabili sta attraendo, negli ultimi anni, un crescente interesse a livello mondiale, in relazione alla necessità di dare soluzione ai gravi problemi di impatto ambientale causati dall'uso non ben ponderato che è stato fatto in passato delle materie plastiche. Ciò ha portato ad una rivalutazione dei polimeri alifatici, sia di origine naturale che sintetica, ed in particolare dei poliesteri alifatici, che presentano, oltre appunto alla biodegradabilità, un'altra caratteristica fondamentale, la biocompatibilità. La combinazione di queste due proprietà li rende, infatti, molto adatti per applicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa. In questo contesto, la ricerca per lo sviluppo di materiali sintetici è diretto verso la progettazione di sistemi di trasporto, di sistemi di supporto e verso la realizzazione di materiali 'intelligenti' sensibili a stimoli fisiologici.

L'uso di tali materiali è stato, tuttavia, limitato dal fatto che la maggior parte dei primi poliesteri alifatici sintetizzati erano caratterizzati da ridotti pesi molecolari e bassi punti di fusione e presentavano, quindi, proprietà meccaniche scadenti a temperatura ambiente (per questo venivano usati principalmente come plastificanti). Come verrà discusso, questo problema è stato superato mettendo a punto particolari strategie di sintesi, quali la copolicondensazione, la miscelazione reattiva e la polimerizzazione ad apertura di anello, le quali si basano sulla copolimerizzazione di diverse specie monomeriche e che consentono di ottenere poliesteri con pesi molecolari maggiori e più facilmente processabili. Grazie allo sviluppo di strategie di copolimerizzazione, alla ricerca di nuovi omopolimeri, si affianca oggi quella di copoliesteri, a blocchi e statistici, e di miscele di poliesteri alifatici, allo scopo di regolare, mediante la combinazione di diverse unità monomeriche, la biodegradabilità e di migliorare le proprietà dei materiali finali. La strategia della copolimerizzazione offre, infatti, notevoli vantaggi, giacché è difficile che un omopolimero di per sé possa soddisfare ad un'ampia gamma di esigenze; ad esempio, non sempre un omopolimero caratterizzato da buone proprietà meccaniche risulta facilmente lavorabile, oppure mostra una buona resistenza agli agenti chimici e fisici. Inoltre, ogni sforzo diretto verso il miglioramento di una determinata proprietà, in fase di sintesi o di lavorazione, può pregiudicare l'ottimizzazione di altre caratteristiche, con conseguenti limitazioni di impiego del prodotto stesso. In quest'ottica, la copolimerizzazione si rivela una strategia particolarmente efficace in quanto consente di non alterare sensibilmente le proprietà già buone dell'omopolimero di partenza, e nel contempo di migliorare quelle non soddisfacenti. Un ulteriore vantaggio di questo approccio consiste nella possibilità di produrre una gamma di materiali con proprietà anche completamente differenti da quelle degli omopolimeri di partenza; infine, dato che le proprietà dei copolimeri variano al variare della composizione, esse possono essere facilmente e rapidamente modulate per soddisfare le esigenze imposte dal tipo di utilizzazione. Un'altra alternativa, che peraltro ha subito negli ultimi anni un progresso commerciale e scientifico vistoso, consiste nel miscelare polimeri già disponibili in commercio. Tale metodo, detto miscelazione reattiva o anche *reactive blending*, permette di ottenere in

modo semplice e rapido nuovi materiali, potenzialmente in numero illimitato e a costi più contenuti, aventi proprietà mirate al tipo di utilizzo.

1.4.1 Strategie di sintesi

In generale, si definisce reazione di polimerizzazione il processo di sintesi dei polimeri mediante l'unione di più molecole di monomero. Sono state messe a punto diverse strategie di polimerizzazione: in ogni caso, al termine della sintesi, si ottengono polimeri formati da macromolecole unite fra loro da legami chimici secondari (di natura debole nel caso delle strutture lineari e ramificate); ciascuna macromolecola, a sua volta, sarà data dalla ripetizione di unità monomeriche, connesse da legami chimici primari covalenti omopolari.

Per quanto concerne i poliesteri alifatici si adoperano prevalentemente tre strategie di sintesi: la policondensazione e copolicondensazione, la miscelazione reattiva e la polimerizzazione ad apertura di anello (ROP).

La policondensazione consiste, in generale, nella polimerizzazione per condensazione a stadi, in cui la progressiva unione delle molecole di monomero, e la conseguente formazione delle macromolecole, è accompagnata dall'eliminazione di piccole molecole, quali prevalentemente acqua, ammoniaca o acidi inorganici. Condizione necessaria affinché tale meccanismo a stadi abbia luogo è la presenza, nei monomeri coinvolti nella formazione dei legami, di gruppi funzionali in grado di reagire tra loro. Nella polimerizzazione a stadi si ha che la reattività dei gruppi terminali di un monomero e di un polimero di una qualsiasi dimensione è approssimativamente la stessa, perciò le unità monomeriche possono reagire sia tra loro sia con le macromolecole in formazione. Il processo di policondensazione coinvolge, dunque, tutta la massa di sostanze reagenti, ossia tutte le molecole presenti possono reagire contemporaneamente e, infatti, i monomeri si esauriscono fin dalle prime fasi della polimerizzazione.

Nel caso specifico dei poliesteri alifatici, la policondensazione costituisce ancora oggi la strategia di sintesi più utilizzata e coinvolge, come reagenti, dioli e diacidi o idrossiacidi. Il principale vantaggio di questa strategia di sintesi sta nel fatto che consente di ottenere una vasta gamma di poliesteri, potendo essere applicata a molte diverse combinazioni di diacidi e dioli. Gli svantaggi connessi alla policondensazione sono, d'altra parte, il fatto che richiede delle elevate temperature, la rimozione dei prodotti secondari e soprattutto lunghi tempi di reazione. Questo procedimento di sintesi risulta, infatti, alquanto lento e tende ad interrompersi prima che le molecole polimeriche abbiano raggiunto elevati pesi molecolari. In aggiunta, durante la policondensazione, non risulta semplice modulare la lunghezza delle catene monomeriche in formazione: tipicamente, infatti, i materiali policondensati presentano indici di polidispersità non inferiori a due.

Considerando che i materiali policondensati acquisiscono le loro proprietà di impiego al raggiungimento di un peso molecolare dell'ordine di 10000-20000 g/mol e che tale processo di polimerizzazione, oltre ad attenuarsi con relativa lentezza, tende a limitare il grado di polimerizzazione del polimero finale, sono state ideate reazioni chimiche, quali la polimerizzazione ad apertura d'anello, che, partendo da lattoni a basso peso molecolare, consentono di sintetizzare poliesteri ad elevato peso molecolare, limitando inoltre la produzione delle sostanze secondarie.

La polimerizzazione ad apertura di anello (ROP) rappresenta un metodo alternativo per la sintesi di polimeri ad elevato peso molecolare, in miti condizioni di reazione e con ridotti tempi di sintesi. Questi ultimi due aspetti costituiscono i principali vantaggi che la ROP presenta rispetto alla policondensazione, oltre al fatto che, agendo sulla diminuzione della temperatura e dei tempi di reazione, fattori che favoriscono l'innescarsi di reazioni secondarie, si risolve anche il problema legato all'eccessiva produzione di sottoprodotti. La ROP consiste in una poliaddizione di lattoni, diesteri ciclici ed acetali chetonici ciclici, la quale può essere condotta, appunto, in miti condizioni di reazione e che, dunque, avviene in presenza di limitate reazioni secondarie. Ciò agevola il controllo di importanti proprietà del polimero in formazione, quali il peso molecolare e la sua distribuzione. Questa strategia di sintesi si basa essenzialmente sulla scissione di legami delle strutture ad anello dei reagenti al fine di ottenere molecole lineari contenenti gruppi esterei.

A fronte dei vantaggi offerti, questa tecnica di polimerizzazione ha come principale limitazione la ridotta varietà dei reagenti su cui può essere applicata: la ROP consente, infatti, di sintetizzare un limitato insieme di poliesteri in relazione al limitato numero di lattoni combinabili.

Un'altra strategia di polimerizzazione significativa in relazione alla sintesi di copoliesteri alifatici, è la miscelazione reattiva o *reactive blending*, termine con cui si intende, in generale, la miscelazione tra due polimeri o tra un polimero ed un composto a basso peso molecolare, che porta alla formazione di un nuovo materiale polimerico. I vantaggi principali di questa tecnica innovativa sono l'elevata velocità di reazione ed il guadagno economico che si ottiene dalla diluizione di un materiale polimerico con uno meno pregiato, senza modificarne in modo significativo le caratteristiche e le proprietà. La miscelazione reattiva può esser condotta in soluzione, allo stato fuso, o anche allo stato solido. Condurre il processo in fuso presenta diversi vantaggi. Innanzitutto, evitando di lavorare in soluzione, si abbattano i costi legati alla rimozione, al recupero e allo smaltimento del solvente. Anche per motivi ecologici è preferibile, quando possibile, seguire procedimenti di sintesi *solvent-free*, evitando così l'impiego di solventi organici. In secondo luogo, condurre il processo in fuso, consente di ridurre le probabilità di contaminazione del prodotto finale.

Questa tecnica prevede, appunto, la miscelazione di unità comonomeriche, in atmosfera inerte e ad elevate temperature, superiori a quelle di fusione dei reagenti nel caso in cui sia condotta allo stato fuso. Queste condizioni, unitamente alla presenza di opportuni catalizzatori, determinano l'innescarsi di reazioni di scissione dei legami tra monomeri e, dunque, la formazione di segmenti di omopolimero. Questi tendono, poi, a ricombinarsi tra loro, formando, così, copolimeri aventi tipicamente struttura a blocchi.

La caratteristica più limitante di questa strategia di sintesi risiede nel fatto che i gruppi reagenti, così come i legami che progressivamente si formano, devono essere termicamente stabili alle alte temperature a cui viene condotta la miscelazione. Date le restrittive condizioni di reazione, soprattutto in termini di temperatura, solo un limitato tipo di reazioni chimiche sono sfruttate nel *reactive blending*, tra cui, principalmente, le reazioni di scambio e interscambio.

Per comprendere fino in fondo le caratteristiche di un materiale polimerico ottenuto per miscelazione reattiva è necessario, pertanto, lo studio delle reazioni di scambio. Sono proprio queste reazioni, le quali avvengono nella miscelazione di polimeri, che consentono di ottenere nuovi materiali polimerici, difficili o anche impossibili da ottenere tramite i classici metodi di sintesi. Queste reazioni si realizzano attraverso lo scambio di unità chimiche, con le seguenti caratteristiche: avvengono tra gruppi funzionali appartenenti a molecole con diversi gradi di polimerizzazione o diversa composizione chimica, si innescano ad elevate temperature e, di norma, sono interazioni reversibili. Se indichiamo i due tipi di polimeri che danno luogo a reazioni di scambio con -AAAAA- e -BBBBB-, i prodotti che si ottengono sono schematicamente così costituiti:



Nei polimeri, in particolare nei policondensati, alle alte temperature utilizzate nei processi di *reactive blending*, possono verificarsi numerose reazioni di scambio, in quanto essi possono contenere vari gruppi funzionali in grado di reagire tra loro. A tal proposito, va tenuto presente che le reazioni di scambio possono coinvolgere sia i gruppi terminali che i gruppi funzionali presenti all'interno delle catene. Questo avviene nei poliesteri, in cui possono verificarsi diversi tipi di reazioni di interscambio in quanto le catene, oltre a contenere i gruppi esteri, possono terminare con gruppi ossidrilici e/o carbossilici.

Variando la durata di questo processo di sintesi è possibile ottenere una progressiva trasformazione della struttura chimica del copolimero in formazione; all'aumentare del tempo di reazione, si verifica, infatti, un numero crescente di reazioni di scambio e quindi si ha una riduzione della lunghezza media dei blocchi che formano le macromolecole: queste evolvono, cioè, da strutture a blocchi (a) a strutture statistiche (o *random*) (b).

1.4.2 Proprietà

Le proprietà fisiche dei poliesteri alifatici dipendono da diversi fattori, quali principalmente la composizione chimica delle unità monomeriche, la flessibilità delle catene, la presenza di ramificazioni e di gruppi polari, la massa molecolare e il grado di cristallinità. Ad esempio, corte ramificazioni laterali innestate sulla catena

principale riducono il grado di cristallinità del polimero, mentre ramificazioni più estese riducono la viscosità allo stato fuso.

Poliesteri alifatici con $x, y \geq 2$ (figura 1.9) sono caratterizzati da una consistente fase cristallina, da temperature di fusione comprese tra 40°C e 90°C e temperature di transizione vetrosa che vanno dai -70°C ai -30°C. La densità di questi polimeri varia tra 0,9 e 1,3 g/cm³. Presentano un'eccellente stabilità termica fino ai 200°C-250°C: a temperature superiori iniziano, però, ad intervenire diversi processi degradativi che portano alla formazione di terminali vinilici. La temperatura di fusione aumenta sensibilmente all'aumentare del rapporto tra il numero di gruppi metilenici e carbossilato in catena, anche se resta piuttosto bassa. Questa è la principale limitazione alla diffusione di questi materiali polimerici, i quali, altrimenti, costituirebbero, grazie alle loro altre proprietà, ottimi materiali per la realizzazione di fibre. A fronte di questa limitazione, va comunque tenuto presente, come già detto, che le loro proprietà chimico-fisiche possono essere ampiamente modulate attraverso il *reactive blending* e, in generale, tecniche di copolimerizzazione.

1.5 Biodegradazione

Il fenomeno della degradazione ed erosione gioca un ruolo fondamentale per tutte le materie plastiche. Pertanto, la distinzione tra materiali polimerici degradabili e non degradabili non risulta così netta, dal momento che, seppure con tempistiche e modalità differenti, tutti i polimeri vanno incontro a degradazione. A fare la differenza in tal senso è, piuttosto, il confronto tra i tempi di degradazione del polimero impiegato in un certo dispositivo e i tempi d'applicazione previsti per quest'ultimo. Dunque, solitamente, l'attributo 'degradabile' si associa a quei materiali che si degradano nel lasso di tempo previsto per una certa applicazione o immediatamente dopo, mentre si parla di polimeri non degradabili nel caso in cui il materiale mostri invece tempi di degradazione maggiori a quelli d'applicazione.

Nel seguito si esamina dettagliatamente il fenomeno della biodegradazione, in quanto la biodegradabilità, unitamente alla biocompatibilità, rappresenta la principale fonte di interesse verso questi polimeri.

La biodegradazione consiste essenzialmente nell'alterazione chimica e fisica che un materiale subisce in ambiente biologico. E' un fenomeno molto vasto che va dalla biodegradazione di materiali operata dai microrganismi in diversi ambienti, quali suolo, acqua o discarica, alle modificazioni che i biomateriali, utilizzati per costruire gli impianti medicali, subiscono *in vivo*. La biodegradazione interessa, infatti, in modo più o meno importante, tutti i materiali impiantati nell'organismo e quindi, in particolare, quelli di natura polimerica. Può essere voluta, come nel caso dei polimeri utilizzati per il rilascio controllato dei farmaci, per le protesi riassorbibili e in generale per tutti quei dispositivi impiantabili con mansioni temporanee, oppure può essere del tutto indesiderata, come nel caso di protesi programmate per durare per molti anni o,

addirittura, per tutta la vita del paziente. Il processo può essere artificialmente indotto ad un tempo specifico dopo l'inserimento dell'impianto oppure può scatenarsi spontaneamente ed inaspettatamente. A causa di questo fenomeno, i materiali impiantati, nel tempo, possono solubilizzarsi, sbriciolarsi e/o assumere indesiderate caratteristiche di deformabilità o di fragilità. I prodotti di degradazione possono risultare tossici per l'organismo oppure possono essere ben tollerati e/o svolgere un'azione farmacologica specifica. In applicazioni recenti, la degradazione di membrane polimeriche viene telecomandata e controllata da sistemi computerizzati esterni all'organismo, permettendo il rilascio di reagenti o di molecole bioattive nella successione e nella quantità richiesta. Un tipico esempio di questa promettente tecnologia è costituito dai sistemi che permettono la determinazione quantitativa della glicemia ed rilascio controllato di insulina *in situ*.

In relazione al fenomeno della biodegradazione di biomateriali impiantabili, vanno considerate le cosiddette condizioni fisiologiche, caratterizzate da valori di pH intorno alla neutralità, da temperature blande e da basse concentrazioni saline. Contrariamente a quanto si potrebbe pensare, l'ambiente biologico risulta particolarmente aggressivo nei confronti di molti materiali che possono andare incontro, in queste condizioni, ad un degrado più o meno rapido. Il tipico ambiente salino acquoso rappresenta infatti il mezzo ideale, non solo per l'instaurarsi di reazioni elettrochimiche di corrosione a carico dei materiali metallici, ma anche per innescare modificazioni di carattere chimico e fisico nei materiali polimerici.

La biodegradazione nel caso dei biomateriali polimerici si manifesta principalmente attraverso la scissione di legami nelle catene principali o laterali delle macromolecole, indotta da sollecitazioni termiche o meccaniche, da processi di ossidazione, fotolisi, radiolisi o idrolisi, che comportano modificazioni sia di natura fisica che chimica. Nella maggior parte dei casi la degradazione del biomateriale è dovuta alla combinazione di più di uno dei meccanismi citati, che possono operare simultaneamente sul materiale. Per quanto riguarda le modificazioni di carattere più propriamente fisico si passa dall'assorbimento, al rigonfiamento, al rammollimento, alla solubilizzazione, alla mineralizzazione, alla cristallizzazione. Non può essere trascurata l'importanza in termini di degradazione di fattori meccanici quali: rotture causate da sollecitazioni meccaniche (*stress cracking*), fratture riconducibili a fatica del materiale o causate da impatti, tensioni dovute a carichi costanti o ciclici. Tutto ciò, aggiungendosi ad abrasioni e fratture superficiali che costituiscono ideali punti di attacco per reazioni chimiche e/o biochimiche, porta ad una accelerazione dei processi di degradazione. Dal punto di vista biologico la situazione risulta particolarmente critica in quanto i biomateriali utilizzati per la costruzione degli impianti protesici sono considerati estranei dall'organismo ricevente; questo suscita inesorabilmente reazioni immunitarie che, nei casi meno favorevoli, portano a danni irreversibili con conseguente compromissione della funzionalità e della durata dell'impianto.

Dunque, data la varietà e complessità dei meccanismi che determinano nel tempo un deterioramento del materiale, per garantire la funzionalità e la durata delle protesi impiantabili, oltre ad una scelta ragionata dei componenti, è indispensabile una vasta sperimentazione preclinica dei materiali e delle procedure

seguite per la fabbricazione dei manufatti. Questa sperimentazione preventiva risulta molto difficile nel caso di impianti destinati a durare per anni o per decenni in condizioni d'uso e di intorno biologico variabili da paziente a paziente. Inoltre, simulazioni classiche, come ad esempio l'accelerazione artificiale dei processi di invecchiamento, le prove su animali e le proiezioni statistiche, non sono in grado di prevedere tutte le variabili che possono portare ad un prematuro calo delle prestazioni. Pertanto, è senz'altro auspicabile, e spesso necessario, il monitoraggio nel tempo delle condizioni e delle prestazioni delle protesi *in vivo*. Anche i trattamenti subiti dai materiali e dai manufatti prima dell'innesto possono condizionare, in senso positivo o negativo, la stabilità e la vita dell'impianto. Dunque, non solo è assolutamente necessario che tutti i trattamenti cui vengono sottoposti i biomateriali, e le protesi in generale, siano compatibili con il tipo di materiale scelto, ma è anche opportuno che le modalità e le condizioni operative utilizzate durante la fabbricazione, come anche le pratiche relative ai trattamenti finali, seguano protocolli precisi, riproducibili, e possibilmente certificati, a garanzia della sicurezza delle operazioni e dei prodotti.

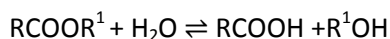
Come detto, la biodegradazione è un processo imputabile a diversi fenomeni che concorrono a determinare alterazioni chimico-fisiche del materiale in ambiente biologico; senza dubbio, però, è l'azione idrolitica dell'acqua a svolgere l'azione predominante nella biodegradazione della maggior parte dei biomateriali polimerici impiantabili, essendo l'ambiente biologico un ambiente prevalentemente acquoso. Nel seguito viene approfondita, pertanto, la biodegradazione idrolitica dei biomateriali polimerici ed, in particolare, dei poliesteri alifatici. In relazione ad applicazioni biomedicali è infatti meno incidente la degradazione enzimatica (considerata anch'essa una forma di biodegradazione), in quanto nell'organismo umano questa ha luogo solo a livello del pancreas: l'unico enzima particolarmente aggressivo nei confronti dei materiali polimerici è, infatti, la lipasi pancreatica.

1.5.1 Degradazione idrolitica

Il processo di degradazione idrolitica comporta la scissione di legami chimici ad opera dell'acqua. Affinché un polimero possa essere degradato in ambiente acquoso deve contenere legami covalenti idrolizzabili, quali il legame estereo. Il fenomeno di idrolisi dei legami polimerici può verificarsi secondo due diverse modalità, in relazione al volume del campione interessato: si parla di degradazione in massa (o di *bulk*) quando la perdita di massa riguarda l'intero volume, mentre la degradazione si definisce di superficie quando coinvolge solo le porzioni più esterne. La degradazione in *bulk* si verifica quando la penetrazione dell'acqua nel materiale risulta più rapida del processo erosivo, che quindi coinvolge anche catene interne alle macromolecole polimeriche. Quando, al contrario, la velocità di penetrazione dell'acqua è inferiore a quella di scissione dei legami idrolizzabili, si determina una degradazione superficiale del polimero. Quest'ultima risulta preferibile, poiché più facilmente controllabile, anche se non sempre possibile da ottenere in quanto molti polimeri non sono sufficientemente idrofobi da evitare che l'acqua penetri

rapidamente all'interno e degradi il materiale più velocemente di quanto vengano erosi gli strati superficiali.

La degradazione idrolitica nel caso dei poliesteri alifatici avviene in *bulk* e coinvolge diversi fenomeni, tra cui l'assorbimento d'acqua, la scissione dei legami esterei e il rilascio di oligomeri o monomeri, secondo la reazione:



La reazione chimica di idrolisi è catalizzata sia da composti acidi che basici. Il sottoprodotto RCOOH è un acido e quindi funge da autocatalizzatore, accelerando così il processo degradativo.

Macroscopicamente, la degradazione idrolitica si verifica in due stadi. In un primo momento, avviene una diffusa scissione statistica dei legami nella catena polimerica, con una concomitante e sostanziale perdita di peso molecolare e, di conseguenza, delle proprietà meccaniche, quali la resistenza a trazione. Nella fase intermedia e finale del processo si assiste, poi, alla scomparsa in soluzione dei frammenti polimerici erosi.

La degradazione può essere, quindi, monitorata attraverso misurazioni delle variazioni di peso molecolare, derivanti appunto dalla scissione dei legami, o di perdita di peso, imputabile al passaggio in soluzione di molecole a basso peso molecolare. La degradazione si concretizza, inoltre, in modifiche morfologiche e topologiche, rilevabili al SEM, che risultano, però, molto più significative nel caso di degradazione superficiale.

1.5.2 Fattori che influenzano la biodegradazione

I meccanismi di degradazione variano in funzione della posizione dell'impianto all'interno dell'organismo, del tipo di tessuto con cui sono a contatto, della risposta del sistema immunitario e delle condizioni generali dell'organismo ospite (età, stato di salute, farmaci assunti), ma soprattutto in relazione alle caratteristiche fisico-chimiche del materiale stesso. Tra queste ultime, quella che più influenza la velocità di degradazione per i polimeri allo stato solido (sottoforma di fibre o film) è la cristallinità; un elevato grado di cristallinità del polimero corrisponde ad una ridotta velocità di degradazione. Infatti, la fase amorfa viene aggredita molto più facilmente dall'acqua rispetto alla porzione cristallina, dove l'elevato grado di ordine ed impacchettamento delle catene, rende quest'ultime meno accessibili all'acqua.

L'orientamento spaziale delle catene, sia nelle regioni amorse che cristalline, è un altro fattore che gioca un ruolo importante nel determinare la velocità di biodegradazione dei polimeri: certi particolari orientamenti delle catene polimeriche rendono più difficoltosa la penetrazione della macromolecola da parte dell'acqua e quindi rallentano in processo degradativo.

In riferimento alle zone cristalline, la presenza di difetti, impurità o monomeri non polimerizzati, costituisce un altro fattore che influenza la velocità di degradazione: questi tendono a ridurre la regolarità del reticolo cristallino e rendono, quindi, la porzione di catena polimerica più facilmente degradabile, al pari delle zone

a struttura amorfa. Dunque, a parità di grado di cristallinità, un maggior grado di perfezione dei cristalli determina un rallentamento del processo di degradazione. Visto che l'aggressione idrolitica agisce preferenzialmente sulle porzioni amorse del materiale, il grado di cristallinità complessivo del campione parzialmente degradato risulterà incrementato a seguito dell'idrolisi.

Anche il grado di porosità della matrice polimerica è un parametro influente sulla velocità di degradazione: nei film polimerici non porosi si osserva, infatti, una degradazione più veloce rispetto che in quelli porosi. Ciò può essere spiegato con il fatto che nei materiali polimerici porosi sono meno frequenti i fenomeni di autocatalisi (che accelerano le reazioni di idrolisi), in quanto i pori facilitano gli scambi ionici.

Per quanto riguarda i poliesteri alifatici, un'altra caratteristica fisica che ne determina la velocità di degradazione è la temperatura di fusione: sono, infatti, più soggetti a degradazione quei poliesteri aventi una minore T_m , o meglio, maggiore risulta la differenza tra la temperatura di esercizio (temperatura corporea) e quella di fusione del materiale, minore sarà la velocità di biodegradazione; questo avviene perché, in prossimità della T_m , le catene polimeriche acquisiscono un'elevata mobilità e di conseguenza sono più facilmente penetrabili dall'acqua. Un discorso analogo è valido in riferimento alla temperatura di transizione vetrosa: operando al di sopra di tale temperatura le catene risultano più mobili e quindi la degradazione procede più velocemente.

La velocità di biodegradazione dipende anche dall'idrofilicità del materiale polimerico: maggiore è, infatti, la bagnabilità della superficie polimerica, maggiore risulta la velocità di degradazione.

Va ricordato, infine, che anche la composizione chimica delle catene polimeriche concorre a determinare la velocità di degradazione dei poliesteri alifatici. Come già detto, l'introduzione di un secondo monomero modifica molte proprietà dell'omopolimero di partenza, come il grado di cristallinità, la temperatura di fusione e quella di transizione vetrosa, ed ha, pertanto, delle ripercussioni indirette sulla velocità di degradazione del copolimero risultante.

Oltre all'incidenza sul processo di degradazione delle caratteristiche chimico-fisiche delle materiale polimerico, appena discussa, non va trascurata quella dell'ambiente di degradazione: la presenza di ossigeno, microorganismi, condizioni termiche e pH sono, infatti, parametri altrettanto influenti sulla velocità di degradazione. In particolare, questa dipende strettamente dalle condizioni di pH dell'ambiente di esercizio. È infatti noto che l'idrolisi dei legami esterei risulta pesantemente influenzata dalle variazioni di pH. Dato che la reazione di idrolisi del legame estereo può essere catalizzata sia da acidi che da basi, la sua velocità può cambiare anche notevolmente in seguito ad aumenti o decrementi del pH dell'ambiente circostante.

In situazioni normali, le condizioni all'interno del corpo umano, quindi le variabili dell'ambiente di degradazione, tendono ad essere mantenute stabili, grazie all'omeostasi: i parametri ambientali nell'intorno dell'impianto sono, pertanto, mantenuti isotermi (tipicamente sui 37°C), neutri (pH pari a 7,4) e asettici e quindi non risultano critici in termini di degradazione. Tuttavia, la situazione *in vivo*, nonostante

preveda parametri ambientali molto meno aggressivi rispetto ai normali standard utilizzati *in vitro*, può essere comunque resa drastica dalle complesse interazioni con attivatori, recettori, inibitori e altre sostanze contenute nei fluidi biologici o presenti nei componenti cellulari.

1.6 Poliesteri e copoliesteri alifatici per uso biomedicale

Di seguito sono riportati i poliesteri più utilizzati in applicazioni biomedicali.

Acido Poliglicolico (PGA). Può essere considerato uno dei primissimi polimeri degradabili studiati per applicazioni biomedicali. Venne sintetizzato per la prima volta nel 1893 quando, nonostante la sua elevata instabilità idrolitica, venne riconosciuto come potenzialmente adatto alla lavorazione in fibre. Venne messo in commercio nel 1970, come materiale per suture riassorbibili. Il PGA costituisce il più semplice poliestere lineare alifatico: presenta una temperatura di fusione compresa tra i 220 °C e i 226 °C, una temperatura di transizione vetrosa compresa tra i 35-40 °C, un'elevata resistenza a trazione (12,5 GPa) e struttura semicristallina (con un grado di cristallinità percentuale pari al 45-55%). È caratterizzato, inoltre, da un'elevata velocità di degradazione *in vivo*, che ne comporta, se sottoposto ad idrolisi, la perdita delle proprietà meccaniche in 1-2 mesi e la perdita quasi completa di peso in 6-12 mesi. A tal proposito, va tenuto presente che il processo di degradazione del PGA si accompagna ad un significativo rilascio locale di acido glicolico; sebbene questo possa essere in parte secreto attraverso l'urina o convertito in diossido di carbonio e acqua tramite il ciclo dell'acido citrico, alti livelli di acido glicolico sono associati ad intense e indesiderate risposte infiammatorie. Queste proprietà ne determinano l'uso, generalmente in forma copolimerizzata, come materiale per suture chirurgiche biorassorbibili. Le suture in PGA hanno gradualmente sostituito le precedenti in collagene, data la loro migliore biocompatibilità tissutale, le idonee proprietà meccaniche e di biodegradazione. Recenti studi nell'ambito dell'ingegneria tissutale si sono focalizzati sull'utilizzo del PGA come materiale di riempimento o per la fabbricazione di scaffolds destinati alla rigenerazione di tessuti ossei, intestinali, linfatici, spinali e cartilaginei. Alcune limitazioni all'uso del PGA, oltre a quella costituita dal rilascio di acido glicolico, sono legate alla solubilità in pochi e costosi solventi organici, all'elevata temperatura di fusione e sensibilità all'umidità e alla quasi completa perdita delle prestazioni meccaniche in seguito a degradazione.

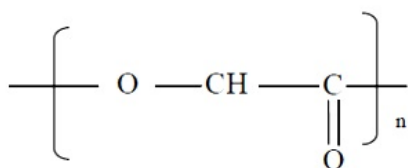


Fig. 1.10 Unità monomerica del PGA.

Acido Polilattico (PLA). Derivante dalla policondensazione dell'acido lattico o dalla ROP del dimero ciclico lattato, è un poliestere che presenta due isomeri ottici, L e D. L'acido lattico si trova per il 99,5% in forma L-isomero e per lo 0,5% in forma D-isomero. La polimerizzazione del lattide verso polimeri ricchi di L-isomero porta ad ottenere prodotti cristallini, mentre risultano amorfi quelli contenenti più del 15% di D-isomero. Le proprietà del PLA variano a seconda dell'isomeria prevalente e pertanto se ne possono distinguere più forme. Quelle che si sono rivelate più promettenti come biomateriali impiantabili sono:

- il PDLLA 50:50; caratterizzato da una distribuzione random di unità L e D, è dunque amorfo, con basso carico a rottura, elevata deformabilità e tempi di degradazione relativamente brevi; presenta una temperatura di transizione vetrosa compresa tra i 55-60 °C.
- il PLLA, nel quale prevale, invece, la forma L-isomero; risulta semicristallino e caratterizzato da una buona resistenza a trazione e compressione, da bassa deformazione a rottura ed elevato modulo elastico; le T_m e T_g del PLLA sono comprese, rispettivamente, tra i 175-178 °C e 60-65 °C.

Il gruppo metile aggiuntivo presente nel monomero del PLA, lo rende maggiormente idrofobico e più resistente alla biodegradazione idrolitica rispetto al PGA; il PLLA ad elevato peso molecolare richiede, infatti, più di 5 anni d'applicazione *in vivo* per essere completamente riassorbito. Il gruppo metile addizionale rende, inoltre, questo poliestere più solubile del PGA in solventi organici come il cloroformio, il metanolo, il benzene, ecc. Nel settore dei biomateriali, il PLA venne studiato per la prima volta nel 1971, come potenziale costituente di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci. Attualmente, il PLLA è ampiamente utilizzato in ingegneria tissutale nella realizzazione di scaffolds per la rigenerazione di ossa, cartilagini, tendini, nervi e vasi sanguigni. La principale limitazione all'impiego del PLLA è costituita dalla sua rigidità: la ricerca sta a tal proposito mettendo a punto particolari strategie di sintesi per ridurre questa caratteristica meccanica, in particolare tramite l'introduzione di componenti flessibili nella sua struttura. Il PDLLA, polimero amorfo, è maggiormente biodegradabile rispetto al PLLA, sebbene anch'esso impieghi più di un anno per erodersi completamente, e presenta una più bassa resistenza meccanica. Principalmente viene impiegato, sottoforma di film, per il rilascio controllato di farmaci in impianti inorganici.

Sia il PLLA che il PDLLA sono solitamente combinati con altri polimeri degradabili come il PLGA, il PEG o il collagene per creare copolimeri con proprietà particolarmente interessanti dal punto di vista applicativo.

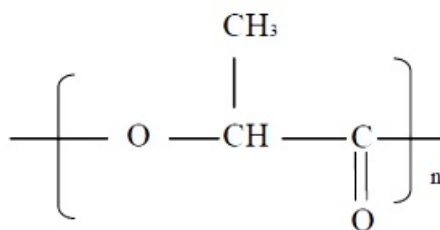


Fig. 1.11 unità monomerica del PLA.

Acido Polilattico-co-glicolico (PLGA). Si tratta di un copolimero statistico ottenuto mediante copolimerizzazione dei dimeri ciclici di acido glicolico e lattico, con il proposito di modulare alcune proprietà dei due omopolimeri di partenza. Attualmente, il PLGA è senza dubbio il poliestere degradabile più studiato e più utilizzato per applicazioni biomedicali ed è, infatti, impiegato nella realizzazione di suture, dispositivi per il rilascio controllato di farmaci e *scaffold* per la rigenerazione dei tessuti. Spesso identificato dal rapporto quantitativo delle due specie monomeriche usate, il PLGA, nelle sue diverse composizioni, tende comunque ad essere amorfo più che cristallino e presenta una temperatura di transizione vetrosa tra i 40-60 °C. Solubile in molti solventi comuni, differentemente dagli omopolimeri costituenti, il PLGA degrada ad una velocità direttamente proporzionale al contenuto di acido glicolico. Venne impiegato per la prima volta come biomateriale nel 1974, quando si realizzarono le prime suture riassorbibili in PLGA. Oggi, come detto, trova svariate applicazioni biomedicali, grazie soprattutto alla modulabilità delle sue proprietà. Viene spesso lavorato in forma di nanosfere, nanofibre o microcapsule, adatte per il rilascio controllato di farmaci, in particolare chemioterapici, ma anche di antibiotici, analgesici, antiinfiammatori, proteine e molecole di RNA. La sua applicazione ha portato a buoni risultati anche nell'ambito dell'ingegneria tissutale, dato che presenta buone proprietà di adesione e proliferazione cellulare: gli scaffold in PLGA, ottenuti per sinterizzazione, *elettrospinning* o stampaggio, si sono, infatti, rivelati particolarmente funzionali. Gli inconvenienti legati all'impiego di questo copoliestere sono, d'altra parte, la difficoltà di modulazione della velocità di degradazione e l'elevata acidità dei prodotti risultanti da questo processo.

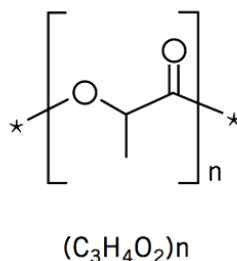


Fig. 1.12 Unità comonomerica del PLGA.

Poli (ε-caprolattone) (PCL). Il PCL è un poliestere idrofobico e semicristallino con un'elevata solubilità in solventi organici, una temperatura di fusione di 55-60 °C e una temperatura di transizione vetrosa di -54 °C. Grazie al fatto che presenta una bassissima velocità di degradazione *in vivo*, un'elevata permeabilità a molteplici sostanze, un elevato potenziale osteoinduttivo e buone proprietà meccaniche, si presta in maniera ottimale alla realizzazione di dispositivi a rilascio controllato impiantabili a lungo termine. Data la sua ridotta temperatura di transizione vetrosa, a temperatura ambiente o corporea il PCL si trova allo stato gommoso; presenta, infatti, una bassa resistenza a trazione (di 23 MPa circa) ma un'elevatissima deformazione a rottura (del 4700% circa): queste caratteristiche lo rendono uno dei principali biomateriali elastici e fanno sì che il PCL sia usato come additivo, presente generalmente in quota maggioritaria, in molti

sistemi polimerici. Il PCL e i compositi a base di PCL sono impiegati anche in ingegneria tissutale, nella realizzazione di *scaffold* per la rigenerazione di ossa, legamenti, cartilagini, pelle, nervi e vasi sanguigni. Come detto, questo poliestere è caratterizzato da un lento processo di degradazione idrolitica, che, come nel caso del PLA, si attua a due fasi: inizialmente si ha una scissione random dei legami esterei e, successivamente, una significativa perdita di peso a causa dell'erosione di monomeri o oligomeri. La tempistica tipica per la completa degradazione del PCL è di circa 2 anni. Questa può risultare incompatibile con certe applicazioni che richiedono un assorbimento più rapido del materiale polimerico e pertanto, in tal caso, si procede copolimerizzando il PCL con altri polimeri biodegradabili, al fine di ridurre il grado di cristallinità del copolimero e aumentarne, quindi, la velocità di biodegradazione.

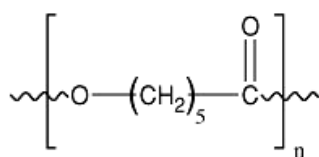


Fig. 1.13 Unità monomerica del PCL.

Poliidrossialcanoati (PHA). Sono una classe di poliesteri alifatici biodegradabili sia di origine sintetica che naturale; possono essere infatti sintetizzati anche da vari generi di batteri, attraverso la fermentazione di zuccheri o lipidi. Il più comune tra questi è il poli(3-idrossibutirrato), PHB, un poliestere semicristallino, particolarmente soggetto all'erosione di superficie, date le sue caratteristiche di idrofobicità e cristallinità. Dalla sua erosione si determina il rilascio dell'acido idrossibutirrico, presente nel sangue come normale costituente. La biocompatibilità, la processabilità e la degradabilità del PHB lo rendono un ottimo materiale per applicazioni di lungo termine in ingegneria tissutale. Sfortunatamente, la sua stabilità nei confronti dei processi degradativi lo rende, invece, poco adatto alla realizzazione di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci.

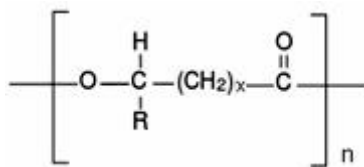


Fig. 1.14 Unità monomerica generica dei PHA.

1.7 Ingegneria Tissutale

L'ingegneria tissutale è definita come 'una scienza multidisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e della medicina allo scopo di realizzare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorare le funzioni di un tessuto o di un intero organo' (Skalak and Fox, 1988). Questo settore di ricerca è caratterizzato da una forte interdisciplinarietà: sono necessari contributi delle scienze di base, della bioingegneria, delle biotecnologie, della biologia molecolare e, ovviamente, della medicina.

Essa prevede due tipologie di approcci: quelli sostitutivi, il cui scopo è, appunto, quello di costruire *ex vivo* tessuti o organi del tutto simili a quelli utilizzati nei trapianti, e quelli istioconduttivi o istioinduttivi *in vivo*, avente lo scopo di ottimizzare la struttura e la composizione di materiali di origine naturale o (semi)sintetica e di indurre la proliferazione di cellule in vivo. In ogni caso, l'approccio dell'ingegneria tissutale è sostanzialmente differente da quello delle più tradizionali terapie che prevedono, ad esempio, la sostituzione del tessuto o organo compromesso mediante trapianto eterologo: i tessuti ingegnerizzati sono infatti progettati non solo per integrarsi con quelli del paziente ma anche per favorire la rigenerazione di tessuto sano (M.S. Rizvi *et al.*, 2012).

La strategia classica dell'ingegneria tissutale prevede la semina di cellule su supporti, detti scaffolds, realizzati in opportuni materiali, eventualmente destinati alla coltura in appositi reattori nei quali vengono fornite stimolazioni di carattere chimico e fisico (bioreattori). La completa colonizzazione dello scaffold darà origine a un costrutto pseudotessutale *in vitro*, che potrà essere impiantato *in vivo* nell'uomo.

A seconda dell'organismo dal quale originano è inoltre possibile distinguere tre tipi di impianti: i) *allograft*: le cellule, i tessuti o i tessuti ingegnerizzati derivano da un altro individuo della stessa specie; ii) *xenograft*: derivazione di cellule, tessuti o tessuti ingegnerizzati da un'altra specie; iii) *autograft*: derivazione di cellule, tessuti o tessuti ingegnerizzati dallo stesso individuo.

La metodologia standard per l'ingegnerizzazione di un tessuto per l'impianto su esseri umani prevede l'isolamento di una linea cellulare specifica tramite una biopsia, effettuata o direttamente sul paziente o su donatore compatibile, e una successiva semina di tali cellule su scaffold al fine di coltivare il costrutto in condizioni specifiche (e ripetibili) per generare un tessuto il più possibile omogeneo. Infine, lo scaffold contenente le cellule, viene impiantato nel paziente, dove nel tempo subirà il processo di degradazione. Il supporto viene quindi progressivamente riassorbito dall'organismo e sostituito con tessuto rigenerato dalle cellule sane impiantate.

Nel caso siano state usate cellule autologhe per la coltura *in vitro* del tessuto, al fine di impiantarli sul paziente una volta rigenerato, si elimina qualsiasi reazione immunitaria, sempre presente (tranne in alcuni limitati casi) quando parti di tessuto od organi vengano trapiantati tra individui diversi, anche della stessa specie.

La premessa di base dell'ingegneria tissutale consiste, dunque, nel combinare la giusta tipologia cellulare con il giusto materiale per la loro proliferazione, in condizioni che permettano la formazione di un tessuto. La natura del biomateriale e le sue proprietà chimiche e fisiche sono fondamentali per creare le condizioni favorevoli alla formazione del tessuto (E. Lavik and R. Langer , 2004).

È noto, infatti, che le cellule possiedono un potenziale innato ad organizzarsi in tessuti ed organi, se fornite dell'ambiente appropriato e di opportuni segnali biochimici. Per questo, un elemento fondamentale nell'ambito delle tecniche di ingegneria tissutale è l'impiego di molecole segnale, quali fattori di crescita o proteine di adesione, in grado di fornire alle cellule il corretto stimolo a colonizzare e diffondere all'interno del materiale adoperato per la realizzazione dello scaffold. Inoltre, allo scaffold possono essere applicati differenti stimoli biofisici, tipicamente attraverso un bioreattore, necessari alla corretta rigenerazione del tessuto.

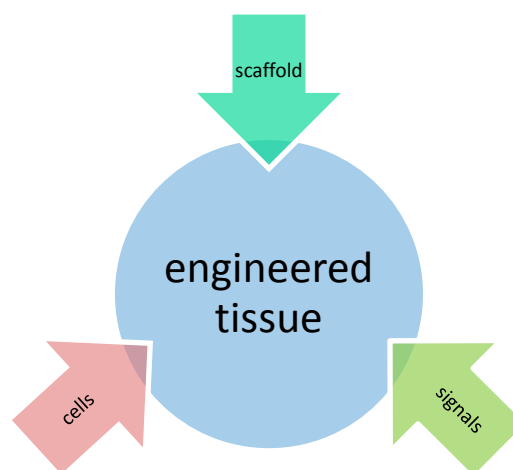


Fig. 1.15 Ingegneria tissutale: cellule, segnali e scaffold.

1.7.1 Cellule

Il processo di sintesi di un costrutto ingegnerizzato ha inizio con la selezione del tipo cellulare necessario alla generazione dello pseudotessuto di interesse. Tra le differenti tipologie cellulari di possibile utilizzo si considerano:

- cellule autologhe: isolate da tessuti naturali dell'individuo in cui saranno reimpiantate;
- cellule allogeniche: isolate da un organismo della stessa specie di quello in cui saranno reimpiantate;
- cellule xenogeniche: isolate da individui di altra specie;
- cellule isogeniche: estratte da tessuti nativi di individui identici, quali gemelli o cloni.

Tecnologie innovative nel campo della biologia molecolare hanno recentemente consentito l'impiego di cellule staminali per la rigenerazione di tessuti ed organi. Una cellula staminale è per definizione una cellula in grado di autorinnovarsi generando una progenie con le stesse caratteristiche della cellula madre, differenziare in più linee cellulari e rigenerare *in vivo* il tessuto di origine.

Durante lo sviluppo e la vita, molti tessuti sono in grado di autoripararsi in seguito ad un danno: questo processo che conduce alla rigenerazione e alla riparazione dipende da una popolazione di cellule di riserva che si dividono lentamente per automantenersi ma che, quando necessario, possono proliferare per fornire i precursori commissionati per uno specifico tipo di cellula differenziata. In base alla potenza, ovvero la capacità di dare origine a una o più specie cellulari, esse si dividono in:

- totipotenti: cellule in grado di svilupparsi in un intero organismo e persino in tessuti extra-embryionali;
- pluripotenti: cellule in grado di specializzarsi in tutti i fenotipi cellulari individuabili in un organismo adulto;
- multipotenti, in grado di specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule;
- unipotenti, capaci di generare solamente un tipo di cellula specializzata;

Le cellule staminali vengono, inoltre, suddivise in due classi: cellule staminali embrionali, ricavate dalle cellule interne di una blastocisti (pluripotenti), e adulte, ovvero cellule non specializzate reperibili tra cellule specializzate di un tessuto specifico adulto (multipotenti, unipotenti).

La possibilità di utilizzare cellule staminali embrionali umane per lo sviluppo di trapianti a carattere terapeutico ha però generato una serie di dibattiti riguardanti gli aspetti etici dell'impiego di embrioni umani come materiale di partenza da cui ottenere cellule staminali. Questa controversia ha orientato gran parte della ricerca sullo studio di cellule staminali adulte come alternativa all'impiego di cellule di origine embrionale. Le cellule staminali adulte o somatiche sono presenti in diversi tessuti e, benché in numero minore rispetto alle embrionali, anch'esse rispondono ai criteri caratteristici delle cellule staminali.

Dati sperimentali in conflitto e questioni irrisolte inerenti al differenziamento, transdifferenziamento e dedifferenziamento, di cellule staminali adulte, garantiscono la prosecuzione degli studi di ricerca in tale settore.

1.7.2 Scaffolds

Come detto, la riparazione dei tessuti nell'ambito dell'ingegneria tissutale prevede la progettazione di un supporto artificiale appropriato il quale deve possedere caratteristiche particolari che lo rendano efficace per sostituire tessuti specifici e per la crescita di certi tipi di cellule (Appelman T.P. *et al.*, 2009). Gli scaffolds

sono, infatti, strutture altamente sofisticate, studiate per favorire l'attacco, l'adesione e la distensione (spreading) cellulare, ed, in seguito, la deposizione di nuovo tessuto.

Le caratteristiche ottimali che un biomateriale deve possedere affinché possa essere processato come scaffold si possono riassumere in:

- biocompatibilità; in particolare, il materiale deve essere caratterizzato da una bassa trombogenicità e immunogenicità, nonché risultare angiogenico e suturabile; deve essere riconoscibile e rimodellabile dalle cellule tissutali del sito d'impianto e dagli enzimi della matrice extracellulare;
- biorisorbibilità, con velocità di degradazione modulabile e compatibile con i tempi di rigenerazione del tessuto vivente e produzione di cataboliti atossici;
- elevata porosità, con pori interconnessi (di diametro tipicamente compreso tra i 200 e i 500 μm) che permettano la diffusione e la crescita cellulare, il trasporto di sostanze nutritive e la rimozione dei cataboliti;
- opportune proprietà superficiali che favoriscano l'adesione, la proliferazione e/o il corretto differenziamento cellulare;
- proprietà meccaniche comparabili a quelle del tessuto da sostituire;
- lavorabilità e riproducibilità in geometrie e dimensioni variabili.

Gli scaffolds non sono, dunque, supporti meccanici passivi, ma partecipano attivamente al processo di ricostruzione del tessuto, provvedendo alla stabilità meccanica della struttura, necessaria per la corretta organizzazione tridimensionale delle cellule in proliferazione.

In genere gli scaffolds vengono fabbricati con materiali polimerici, eccetto quelli destinati alla rigenerazione del tessuto osseo, il quale richiede in aggiunta la presenza di una matrice inorganica. È stata sperimentata una varietà di polimeri, sia naturali che di sintesi, per la costruzione dei supporti; quelli di origine naturale includono polisaccaridi (alginato, agarosio e acido ialuronico) e proteine (collagene e gelatina), mentre quelli sintetici comprendono: la famiglia di poliesteri alifatici derivanti dall'acido lattico e glicolico, i poliidrossialcanoati, il policaprolattone, le polianidridi, i poliortoesteri e i policarbonati.

Il principale svantaggio derivante dall'impiego di polimeri sintetici per la realizzazione di scaffolds risulta, in generale, la ridotta bioattività; i polimeri di origine naturale, benché molto biocompatibili e biologicamente attivi, come limitazione presentano, invece, delle scarse proprietà meccaniche, che ne restringono il campo di applicabilità; inoltre, molto spesso, l'utilizzo di polimeri naturali non garantisce l'uniformità e la riproducibilità del prodotto. Vista l'impossibilità sia dei polimeri naturali che dei sintetici di coniugare le diversificate proprietà richieste dalle applicazioni in ingegneria tissutale, la ricerca di biomateriali per scaffolds si è, recentemente, spostata sui copolimeri, che, come già evidenziato, sono caratterizzati da un'elevata modulabilità delle proprietà, mediante la combinazione di più unità comonomeriche. Tra i copolimeri più utilizzati nell'ambito dell'ingegneria tissutale troviamo alcuni copoliesteri alifatici, come l'acido polilattico-co-glicolico, PLGA.

I supporti tridimensionali più all'avanguardia, in fase di sperimentazione, contengono molecole bioattive, come i fattori di crescita, che vengono rilasciati dalla matrice polimerica per degradazione e/o diffusione allo scopo di promuovere la proliferazione cellulare all'interno dello scaffold. In alcuni casi la superficie del supporto esposta all'interazione con le cellule viene fisicamente o chimicamente modificata per inserire sequenze polipeptidiche segnale.

1.7.3 Distribuzione dei segnali in ingegneria tissutale

Per favorire la rigenerazione del tessuto non è sufficiente la corretta combinazione di cellule e scaffolds, ma è necessario fornire alla cellule stesse opportuni segnali che ne regoli la differenziazione, la migrazione e la proliferazione. Questi segnali sono forniti dai fattori di crescita, particolari peptidi che, legandosi con i recettori transmembrana specifici della cellula bersaglio, forniscono l'informazione necessaria al nucleo per indurre un certo tipo di risposta nella cellula. Tipicamente questi polipeptidi esibiscono un range d'azione limitato, dovuto al difficoltoso processo di diffusione attraverso la matrice cellulare. L'ingegneria ha per questo sviluppato strategie distinte per il trasporto di questi fattori di crescita: l'immobilizzazione chimica all'interno di una matrice polimerica o l'incapsulamento fisico all'interno di una membrana, anch'essa polimerica. Entrambi i metodi si basano su diffusione e rilascio programmati nel tessuto circostante, facilitati dall'impiego degli scaffold a pattern tridimensionali, che consentono un alto livello di controllo sulla distribuzione del segnale, dato che a questi sono ancorate le cellule bersaglio.

Le due tecniche principali usate per coniugare i fattori di crescita ai biomateriali (sintetici o naturali), rendendoli disponibili alle cellule che verranno in contatto con la matrice, si basano :

- sull'adsorbimento fisico dovuto a legami a idrogeno o ad interazioni idrofobiche con molecole eccipienti (approccio non covalente);
- sull'immobilizzazione covalente dei fattori di crescita (o molecole che ne mimano il funzionamento) alla matrice (approccio covalente).

L'adsorbimento dei fattori di crescita sfrutta in genere interazioni secondarie dipolo-dipolo o legami a idrogeno tra questi e le matrici, o interazioni indirette attraverso proteine intermedie o altre molecole biologiche: proteine come eparina, fibronectina, gelatina e piccoli oligopeptidi possono essere rivestite chimicamente o fisicamente per fornire siti specifici in grado di immobilizzare i fattori di crescita o morfogeni. I materiali usati per percorrere questa strategia sono essenzialmente gel biopolimerici contenenti fibronectina, laminina, collagene, elastina, acido ialuronico o una varietà di idrogel sintetici, data la loro capacità di riprodurre la membrana extracellulare.

L'approccio covalente permette ai fattori di crescita legati alla matrice di degradarsi molto più lentamente, consentendo un rilascio prolungato. I fattori vengono coniugati ai polimeri tramite gruppi funzionali precedentemente incorporati durante il processo di copolimerizzazione o tramite trattamenti chimici o

fisici. Questa strategia non è immune da limitazioni, come la difficoltà nell'assegnazione del sito di accoppiamento sulla proteina e la possibile perdita di bioattività delle proteine a causa dell'immobilizzazione o del danneggiamento dei gruppi funzionali. È importante notare come l'ingegneria tissutale sfrutti meccanismi tipici del *drug delivery* per il trasporto dei fattori di crescita (al posto dei farmaci) come i meccanismi diffusionali, il *linking* alle matrici polimeriche, il rilascio controllato da fattori esterni come pH, temperatura e pattern tridimensionale dello scaffold.

1.8 Biocompatibilità

La caratterizzazione dei biomateriali e dei dispositivi destinati ad un contatto sul medio e sul lungo termine con l'organismo (fluidi biologici, tessuti e organi) non può essere completa senza una valutazione circa la loro biocompatibilità. Questa valutazione va condotta allo scopo di esaminare le prestazioni del biomateriale in condizioni simili a quelle dell'ambiente biologico.

La biocompatibilità di un materiale, infatti, non consiste unicamente nell'assenza di effetti tossici sui tessuti con cui viene a contatto, ma piuttosto nella sua abilità a svolgere la funzione per la quale è stato progettato, innescando una risposta appropriata nell'ospite. Ovviamente, un dispositivo deve essere realizzato e validato in funzione della problematica medica che si vuole risolvere: un materiale utilizzato in modo soddisfacente per una data applicazione, e quindi considerato biocompatibile in un certo ambito, può, se usato in modo differente o impiantato in un sito diverso da quello previsto, indurre una differente risposta dell'organismo, cioè può, in definitiva, dar luogo ad un risultato insoddisfacente.

La biocompatibilità di un impianto viene valutata sulla base di diversi parametri relativi sia alle caratteristiche chimico-fisiche del materiale, che alle caratteristiche dell'ospite (Fournier E *et al.*, 2004).

I principali fattori relativi all'organismo ospite dai quali dipende la biocompatibilità sono la specie, il corredo genetico, il sito dell'impianto e il suo microambiente, mentre quelli relativi al materiale sono la forma, le dimensioni, la chimica di superficie, la ruvidità, il design, la morfologia e la porosità, la composizione, le tecniche di sterilizzazione, le procedure di applicazione, la durata del contatto e la facilità o meno a degradarsi (Karande T.S *et al.*, 2008).

Un'accurata sterilizzazione del dispositivo impiantabile è fondamentale al fine di evitarvi la colonizzazione di agenti patogeni come muffe e batteri. Anche il fattore tempo è rilevante nella determinazione della biocompatibilità: una membrana per emodialisi, ad esempio, è utilizzabile soddisfacentemente perché rimane a contatto con il sangue per poche ore, un contatto prolungato comporterebbe danni per il paziente; analoghe considerazioni possono essere fatte per un catetere che può rimanere inserito al più per una settimana, o per una protesi ortopedica, che può invece rimanere impiantata per tutta la durata della vita del paziente.

La biocompatibilità è, inoltre, strettamente connessa ai fenomeni di superficie, rappresentati dalle interazioni cellula-cellula, cellula-polimero, polimero-proteina (Laurencin C.T. *et al.*, 1994). Da questo punto di vista, un vantaggio notevole è offerto dai polimeri sintetici poiché possono essere facilmente modificati, soprattutto nella chimica di superficie, in modo da ottenere variazioni nell'intensità e nella durata della reazione tissutale che innescano.

Sfortunatamente la biocompatibilità non è una grandezza misurabile e di conseguenza non esistono metodi per effettuarne delle misure quantitative precise. Il giudizio finale per stabilire la biocompatibilità può basarsi solamente sulla verifica di una soddisfacente prestazione clinica. In ogni caso, prima che un dispositivo medico possa essere commercializzato, e dunque utilizzato in ambito clinico, è necessario che la sua biocompatibilità venga acquisita, testata e documentata con certezza ed infine approvata dagli organismi deputati (FDA, marchio CE, ecc.). Questo è quanto prescritto dalle leggi nazionali ed internazionali che, in generale, richiedono la prova della sicurezza ed efficacia nell'utilizzo dei dispositivi medici in condizioni di esercizio realistiche.

Secondo la normativa vigente, il primo passo nella valutazione della biocompatibilità consiste nella caratterizzazione *in vitro* delle proprietà chimico-fisiche delle materie prime con cui verranno costruiti i prototipi dei dispositivi biomedici; questi dati vanno comparati con i risultati che si hanno al termine di ogni fase del processo produttivo (manifattura, sterilizzazione, confezionamento, stoccaggio).

La verifica della biocompatibilità vera e propria, intesa come analisi delle interazioni materiale-organismo, viene eseguita sui soli dispositivi che abbiano superato queste prove preliminari e consiste nell'applicazione successiva di test di diverso livello: test *in vitro* con cellule e tessuti (test di primo livello), test *in vivo* su modelli animali (test di secondo livello) e *trials* clinici (test di utilizzazione). Questo screening attraverso test di ordine crescente è riconosciuto internazionalmente da produttori, ricercatori ed utilizzatori, come metodica fondamentale per la validazione della biocompatibilità di biomateriali in fase di sviluppo.

A questo scopo, le organizzazioni nazionali ed internazionali che si occupano di standardizzazione, come ASTM (*American Society for Testing and Materials*), ISO (*International Standards Organization*), FDA (*Food and Drug Administration*), NIH (*National Institutes of Health*), hanno sviluppato specifiche linee guida e procedure da seguire nella valutazione della biocompatibilità dei dispositivi medici.

1.8.1 Test *in vitro*

I principali vantaggi dei test *in vitro* sono legati ai costi contenuti, alle piccole dimensioni delle apparecchiature richieste e alla relativa velocità di esecuzione che permette di valutare rapidamente, e confrontare, molti materiali e molti dispositivi. Solitamente si utilizzano come modelli sperimentali le linee cellulari stabilizzate disponibili presso banche cellulari nazionali ed internazionali (come, ad esempio,

l'American Type Culture Collection, ATCC); esse, a differenza delle colture primarie (cellule appena isolate dagli organi), garantiscono una maggiore riproducibilità, efficienza e disponibilità (Northup S.J. *et al.*, 2004). I test *in vitro* comprendono principalmente saggi di citotossicità, citocompatibilità, mutagenicità ed emocompatibilità.

I test di citotossicità, in accordo con lo standard ISO 10993-5, rappresentano un metodo di valutazione dei danni biologici acuti provocati dalle sostanze rilasciate dai dispositivi medici tramite l'osservazione degli effetti che queste producono su cellule coltivate in vitro in un mezzo nutriente.

Le prove di citotossicità consistono nella verifica della biocompatibilità di un materiale in termini di vitalità, proliferazione e crescita di una specifica coltura cellulare e possono essere realizzate in due diverse modalità: si distinguono, infatti, test di citotossicità diretta e indiretta.

I primi si basano sull'utilizzo del materiale in diretto contatto con la coltura cellulare adottata. I test di citotossicità indiretta, al contrario, non prevedono il diretto contatto tra popolazione cellulare e materiale da validare: in questo caso, il test si effettua mettendo in contatto con il materiale il terreno di coltura, il quale successivamente verrà aggiunto alle cellule, oppure ricavando dal materiale da validare un estratto, tramite il metodo dell'eluizione, il quale verrà, quindi, utilizzato come nuovo nutriente delle colture cellulari. Anche le prove di citotossicità indiretta si caratterizzano, solitamente, mediante l'utilizzo di appositi coloranti.

In entrambi i casi, i monostrati cellulari, se si tratta di cellule in adesione, possono quindi essere osservati al microscopio per scoprire l'insorgere nel tempo di eventuali segnali di un'azione tossica, quali cambiamenti nelle dimensioni o nell'aspetto morfologico dei componenti cellulari, lisi cellulare, ecc. Una rilevazione più accurata della vitalità cellulare avviene, però, con l'analisi delle principali funzionalità della cellula; la citotossicità di un materiale viene, cioè, valutata in relazione all'integrità della membrana cellulare e all'attività enzimatica o di biosintesi; a tale scopo è necessario eseguire test colorimetrici.

Un'altra tipologia di test *in vitro* è quella dei saggi di mutagenicità, con cui è possibile valutare l'eventuale variazione del patrimonio genetico della cellula in seguito al contatto con il biomateriale da esaminare. Tra i saggi di mutagenicità quello più utilizzato è il *test di Ames*, messo a punto nel 1975 dal professor Ames dell'Università di Berkeley, California. In questo caso, il modello sperimentale non è rappresentato da linee cellulari, bensì da ceppi di *Salmonella typhimurium* resi auxotrofi per l'istidina (cioè istidinadipendenti), che, quindi, non sono in grado di crescere in un terreno privo di questo aminoacido, essendo divenuti geneticamente incapaci di sintetizzarlo. Pertanto, possono fungere da indicatori dell'attività mutagena di agenti genotossici poiché, in loro presenza, i geni alterati deputati alla sintesi dell'istidina riprendono la loro primitiva funzionalità (*retromutazione*), consentendo ai batteri di crescere formando colonie visibili. Il numero delle colonie batteriche cresciute in assenza di istidina (*revertenti*) fornisce una misura dell'attività mutagena del composto (per es. un biomateriale) o della miscela in esame.

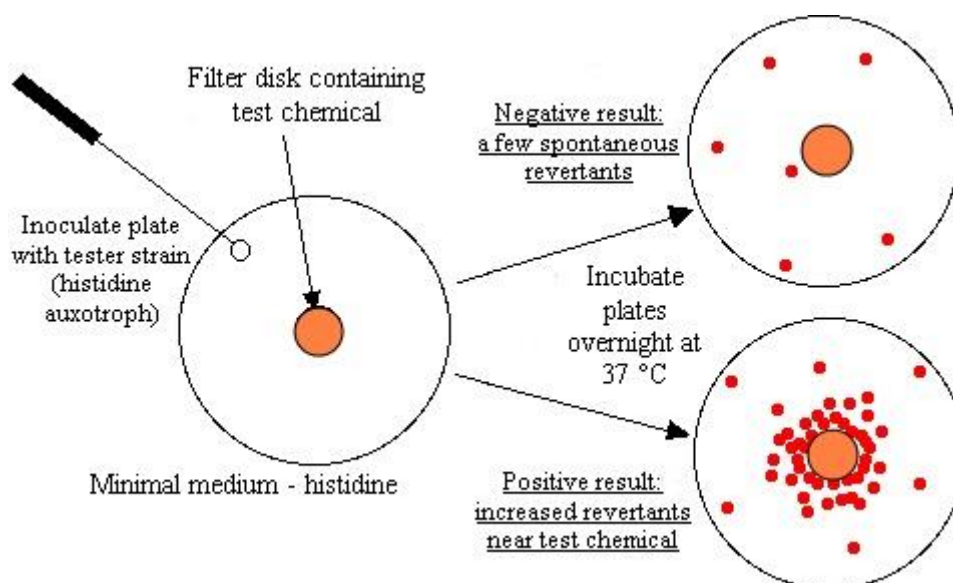


Fig. 1.16 Test di Ames.

Infine, tra i test *in vitro* vanno ricordati quelli di emocompatibilità che possono essere eseguiti in condizioni statiche o dinamiche (in flusso), a seconda della destinazione d'uso del materiale/dispositivo biomedico. Tali test valutano le alterazioni morfologiche e funzionali a carico delle cellule del sangue e di quelle endoteliali.

Le analisi morfologiche (osservazioni al microscopio ottico o a quello elettrico a scansione) implicano lo studio di eventuali alterazioni strutturali, quali degenerazione, lisi o morte che possono verificarsi in seguito ad applicazione dell'impianto. Le analisi funzionali riguardano la valutazione di alcune caratteristiche delle cellule endoteliali come la capacità di adesione, il loro indice mitotico, la loro attività secretiva in presenza dell'impianto. L'emocompatibilità di materiali e dispositivi viene determinata, inoltre, verificando la formazione di coaguli sulla superficie, l'adesione delle piastrine, l'attivazione del complemento e dei leucociti (Siddarth D. *et al.*, 2012).

I test *in vitro* sono attualmente considerati efficaci per una valutazione preliminare della biocompatibilità dei materiali. Come per qualsiasi altro modello, anche in questo caso va prestata parecchia attenzione nell'interpretare i risultati, evitando rischiose estrapolazioni. Tali test ci consentono di studiare le funzioni e i meccanismi di singole linee cellulari e questo comporta evidenti limiti in considerazione della notevole complessità dell'ambiente biologico reale (Ratner B.D., 2004). Per queste ragioni, i dati dei test *in vitro* vanno integrati con i risultati che si devono ottenere attraverso studi su modelli animali per fornire una spiegazione più adeguata dei meccanismi che dirigono, mediano e controllano le interazioni tra materiali e tessuti, in un ambiente che è di per sé estremamente complesso, interattivo e dinamico.

1.8.2 Test *in vivo*

Sono sicuramente i test più validi per verificare la biocompatibilità dei materiali e dei dispositivi, ma la loro applicazione spesso risulta difficile a causa di problemi etici, degli alti costi e dei lunghi tempi che richiedono. Inoltre, risultati positivi non necessariamente provano la biocompatibilità sull'uomo: come è noto, infatti, differenze nelle specie animali compromettono l'estrapolazione degli esiti delle prove *in vivo* fra modelli diversi. In virtù della loro omologia con l'uomo, sono i primati non umani i modelli animali più attendibili. L'utilizzo di animali in laboratorio per la ricerca e per le prove di biocompatibilità implica una grande responsabilità e dovrebbe essere preso in considerazione solo dopo una completa caratterizzazione preliminare dei materiali/dispositivi, dopo adeguate simulazioni al computer ed esauriente verifica *in vitro*. I ricercatori dovrebbero identificare, di volta in volta, la specie animale più adatta al tipo di studio, selezionando il minimo numero di individui che possa condurre a risultati statisticamente significativi.

I test su animali utilizzati per la valutazione della biocompatibilità dei materiali possono essere suddivisi in tre principali categorie:

- Test non funzionali
- Test *ex-vivo*
- Test funzionali

Nel caso di test non funzionali, campioni di forma arbitraria sono impiantati nei tessuti molli (per esempio, per sotto cute, nel muscolo, nella cavità peritoneale) mediante interventi chirurgici poco invasivi. Hanno breve durata (giorni-mesi), ma forniscono significative informazioni circa le interazioni locali tra materiale e tessuto e le eventuali complicanze sistemiche. I dati sono raccolti in assenza di carichi meccanici e mancano di ogni valutazione circa la funzionalità della protesi.

I test *ex-vivo* si basano sull'utilizzo di derivazioni arteria-vena e vena-vena che permettono al sangue dell'animale di fluire attraverso i materiali da testare in un circuito esterno. In questo caso si valutano l'accumulo di proteine, l'adesione delle piastrine e la formazione di coaguli, allo scopo di verificare la compatibilità del materiale con il sangue.

L'esecuzione di test funzionali prevede l'inserimento nell'animale del dispositivo che si vuole testare in scala appropriata (ad esempio, una protesi d'anca o una valvola cardiaca opportunamente dimensionate), per svolgere la funzione prevista nell'animale, in condizioni analoghe a quelle previste per l'impiego nell'uomo. Si tratta di studi a lungo termine che richiedono speciali progettazioni e risultano pertanto assai costosi e complessi.

Anche per l'esecuzione dei test *in vivo*, come per quelli *in vitro*, metodologie e procedure dettagliate sono disponibili nelle pubblicazioni di ASTM e NIH; inoltre, un utile riferimento è rappresentato dalle tabelle basate sulle linee guida FDA/ISO: esse permettono di identificare le tipologie di test da adottare in funzione

dell'uso previsto (esterno, comunicante con l'esterno, interno), del tipo di tessuto a contatto con il materiale, della durata del contatto (temporaneo, breve termine, lungo termine). Evidentemente, quanto più prolungato è il contatto con l'organismo, tanto maggiore è il numero dei test prescritti.

I test *in vivo* più comunemente praticati sono:

- test di sensibilizzazione (standard ISO 10993-10): viene effettuato sulla pelle di cavie (soprattutto porcellino d'India) ed è finalizzato all'osservazione dell'insorgere di reazioni di sensibilizzazione in conseguenza dell'azione ripetuta e prolungata di sostanze rilasciate dal materiale, capaci di interagire con il sistema immunitario. La reazione di sensibilizzazione si manifesta come arrossamento e rigonfiamento dei tessuti. Vi sono due modi alternativi di condurre il test di sensibilizzazione: Test di Buehler e Test di massimizzazione o di Magnuson-Kligman. Il primo prevede una fase di 'induzione' in cui il materiale da saggiare viene posto direttamente a contatto con la pelle rasata del dorso di porcellini d'India (operazione ripetuta almeno tre volte a settimana per tre settimane). Segue un periodo di riposo di due settimane per permettere il manifestarsi di una risposta nella cavia; quindi avviene l'esposizione finale al biomateriale. Il secondo prevede l'applicazione ripetuta a gruppi separati di porcellini d'India di estratti del materiale con soluzioni saline o con oli. Questo metodo è più sensibile del precedente e trova larga applicazione nel caso di dispositivi che entreranno in contatto con aree diverse dalla pelle.
- test di irritazione (standard ISO 10993-10): valuta la risposta infiammatoria locale ad applicazioni singole, ripetute e continue della sostanza in prova, senza che sia coinvolto un meccanismo immunitario. Per questo tipo di test vengono utilizzati direttamente i materiali da analizzare o loro estratti in fluidi salini o in oli vegetali. L'applicazione del campione avviene generalmente a livello intracutaneo, della pelle primaria o oculare. Sintomi tipici dell'irritazione sono arrossamento, gonfiore, riscaldamento e dolore.
- test di impianto (standard ISO 10993-6): fornisce indicazioni sulla specie animale da impiegare come cavia, sul tipo di tessuto più adatto all'impianto, su quanto tempo il materiale deve rimanere impiantato, sul metodo d'impianto e sulla valutazione della risposta biologica.

L'applicazione generale di questi test prevede il taglio del materiale in un campione della forma desiderata, la sterilizzazione di tale campione, il suo impianto in condizioni asettiche e l'esame finale dei tessuti circostanti il luogo dell'impianto, dopo un periodo variabile tra una settimana e alcuni mesi.

La risposta biologica all'impianto viene valutata osservando al microscopio sezioni di tessuto opportunamente colorate con le tecniche di immunoistochimica; ciò consente di determinare il tipo di cellule presenti, l'eventuale insorgenza di necrosi, la presenza di collagene e molti altri parametri. Per gli impianti a breve termine si utilizzano, generalmente, come cavie, topi, ratti, porcellini d'India o conigli; per i test a lungo termine (impianti in tessuto sottocutaneo, muscolo, osso) si utilizzano anche cani, pecore, capre ed altri animali che abbiano una lunga aspettativa di vita.

Come previsto dagli standard ISO 10993, esistono anche altri test *in vivo* per valutare la tossicità dei materiali utilizzati nei dispositivi biomedicali. Tra questi ricordiamo i test di tossicità sistemica acuta, subacuta e subcronica che forniscono indicazioni sugli effetti potenzialmente nocivi provocati dai materiali o dispositivi su tessuti e organi *target* lontani dal sito di impianto; un esempio è rappresentato dal test di pirogenicità eseguito sul coniglio, che valuta la comparsa di febbre come manifestazione di una reazione infiammatoria sistemica successiva all'impianto. Infine, tra i test *in vivo*, ricordiamo quelli di genotossicità (test dei micronuclei), carcinogenicità, tossicità sulla funzione riproduttiva e sullo sviluppo embrionale (teratogenicità), biodegradazione (Anderson J.M. and Schoen F.J., 2004).

1.8.3 *Trials* clinici

A prescindere dal successo dei precedenti test *in vitro* e su modello animale, non è possibile prevedere in ogni loro aspetto le prestazioni di materiali e dispositivi sull'uomo senza *trials* clinici. La sperimentazione clinica è necessaria prima di rendere disponibile al pubblico il materiale/dispositivo.

Per poter richiedere alle agenzie nazionali ed internazionali (per esempio, FDA o Ministero della Salute) l'autorizzazione alla sperimentazione clinica, è necessario documentare con precisione e chiarezza gli esiti positivi dei precedenti test (*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*). Va poi data prova dei benefici per i riceventi e dell'assenza di rischi. Inoltre, devono essere descritti nel dettaglio il materiale/dispositivo, la procedura chirurgica, il trattamento post-operatorio e il tipo di valutazione attesa. La valutazione può riguardare il confronto tra le condizioni del paziente prima e dopo l'applicazione del dispositivo biomedico, oppure il confronto con altri soggetti sani di un gruppo di controllo scelto adeguatamente per sesso, età, salute. I protocolli sperimentali sono sottoposti al giudizio degli organismi deputati, la cui approvazione assicura il rispetto non solo delle leggi vigenti, ma anche dei diritti e della dignità dei pazienti che si sottopongono alla sperimentazione fornendo il loro consenso informato.

Una volta approvata, la sperimentazione prevede di inserire il materiale/dispositivo in un certo numero di soggetti come parte di uno studio, limitato ma ben controllato e monitorato, finalizzato allo svolgimento di una sequenza di tre fasi (I, II e III). Gli esiti della sperimentazione, con l'indicazione dei risultati (sia positivi che negativi), dei dati del decorso clinico (*follow-up*), dei dati quantitativi e dei pareri circa il significato delle conclusioni, devono essere presentati all'organismo notificato che avrà la responsabilità dell'approvazione finale prima della commercializzazione. Ovviamente le aziende che vogliano condurre questi studi così complessi devono programmare ingenti investimenti prima di arrivare al termine del processo di sviluppo di prodotti biomedicali commerciali, il che richiede generalmente 15-16 anni.

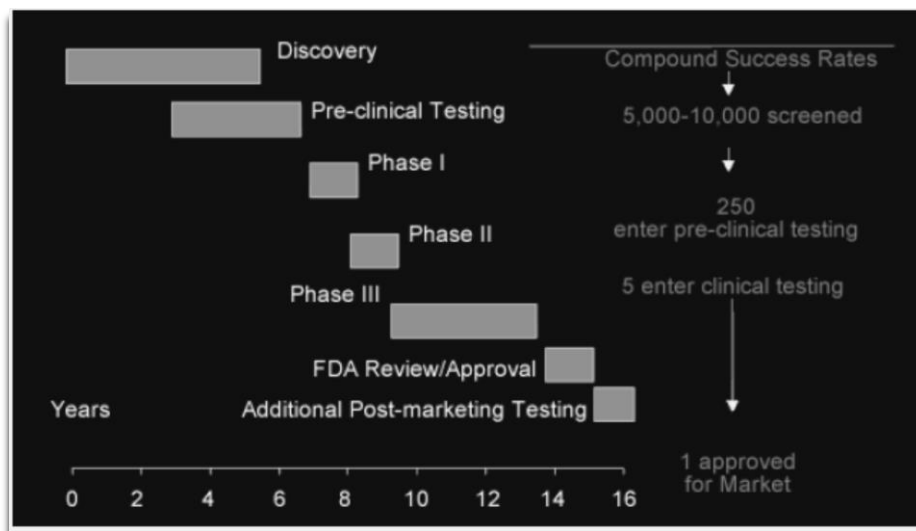


Fig. 1.17 Fasi dello sviluppo di un presidio biomedico dalla progettazione fino alla commercializzazione

Infine, informazioni importanti possono essere ricavate dal recupero degli impianti, delle protesi e dei tessuti circostanti da pazienti che sono al termine della loro vita o che hanno subito il fallimento dell'impianto. L'esame dei materiali espantati fornisce utili evidenze circa la loro sicurezza ed efficacia, permette di determinare le cause dell'eventuale fallimento e di aumentare le conoscenze relative alle interazioni materiali-tessuti biologici. Queste informazioni potrebbero essere cruciali per migliorare la progettazione e la fabbricazione, per stabilire criteri di selezione, per sviluppare protocolli e tecniche per le diverse fasi della valutazione degli impianti.

1.8.4 Emocompatibilità

L'interazione di un biomateriale con il sangue è un aspetto di particolare importanza nella valutazione della biocompatibilità del materiale stesso, in quanto gran parte delle protesi, degli organi artificiali e, in generale, dei dispositivi impiantabili svolgono la loro funzione in diretto contatto con il sangue e perché i danni prodotti al sangue hanno sia effetti specifici locali sia effetti sistemici, data la funzione di trasporto di questo tessuto connettivo. Il sangue, essendo un tessuto liquido, non è soggetto ai processi di riparazione al pari degli altri tessuti, in quanto non è possibile indurre lesioni alla sua continuità, come avviene, invece, nel caso dell'osso o della cute. Piuttosto, le reazioni del sangue all'impianto di materiali estranei sono volte proprio alla riparazione degli altri tessuti eventualmente lesi. Il requisito fondamentale di un biomateriale che deve svolgere la sua funzione a contatto con il sangue è l'emocompatibilità, termine che indica la biocompatibilità specifica con il sangue.

L'emocompatibilità di un biomateriale si verifica considerandone gli effetti sia sulla componente liquida che su quella corpuscolata del sangue. Infatti, questo è un tessuto connettivo che si compone di una parte liquida, il plasma, contenete essenzialmente proteine in soluzione, e da una parte corpuscolata, costituita

da globuli rossi, globuli bianchi e piastrine. I due principali effetti nocivi che possono essere causati dal contatto del sangue con un materiale estraneo all'organismo sono la coagulazione indesiderata, che interessa la parte liquida del sangue, e il fenomeno dell'emolisi, che porta ad un grave danneggiamento della parte corpuscolata.

Danno alla componente liquida del sangue

La coagulazione è un processo fisiologico che ha lo scopo di impedire l'emorragia conseguente alla lesione di un vaso sanguigno, tramite la totale o parziale solidificazione di una certa massa di sangue. Il processo della coagulazione determina, quindi, un cambiamento delle proprietà fisiche del sangue, che da liquido diventa solido, ma non consiste in un passaggio di stato, bensì in un complesso insieme di reazione biochimiche che interessa tutto il sistema della coagulazione, formato da proteine attivabili in grado di creare, appunto, il coagulo. Quest'ultimo è costituito da un reticolo di fibrina, una proteina insolubile, e globuli rossi. In generale, il sistema della coagulazione si attiva quando il sangue va in contatto con superfici diverse dalla parete interna del sistema cardiocircolatorio; pertanto, il contatto con un materiale impiantato innesca con facilità questo processo di solidificazione del sangue, spesso indesiderato in relazione alla corretta funzionalità del dispositivo impiantato, in quanto associato a diversi rischi, quali l'occlusione di protesi vascolari e di cateteri e la limitazione funzionale di protesi valvolari cardiache.

In condizioni fisiologiche, esiste anche un processo, detto fibrinolisi, che previene l'eccessiva crescita del coagulo una volta che quest'ultimo ha raggiunto dimensioni tali da impedire perdite di sangue attraverso il vaso leso. Normalmente i processi di coagulazione e fibrinolisi si equilibrano reciprocamente, determinando il giusto grado di coagulazione quando il sangue va in contatto con superfici estranee. Questo equilibrio può essere facilmente alterato dall'introduzione nell'organismo di materiale estraneo. Un ulteriore rischio associato ad un'eccessiva coagulazione è la tromboembolia. Un coagulo può rimanere adeso alla zona in cui si è formando, ed in tal caso si parla di trombo, oppure, raggiunte certe dimensioni, può distaccarsi ed essere trasportato dalla corrente ematica, diventando un embolo. L'embolo, che tipicamente si distacca dalle pareti arteriose, fluisce verso arteriole di calibro sempre minore dove può, quindi, occludere completamente il lume del vaso, arrestando il flusso di sangue nelle zone più a valle. Quando si verifica la completa occlusione di un vaso a causa di un embolo si parla di tromboembolia, che pertanto costituisce un fenomeno molto pericoloso.

Dati i rischi associati ad un'eccessiva coagulazione indesiderata del sangue in seguito all'introduzione di materiale estraneo all'organismo, sono state messe a punto diverse metodologie di trattamento dei biomateriali volte a limitare questo processo e quindi, in particolare, i fenomeni tromboembolici ad esso connessi. Tali metodologie consistono nella modulazione di certe caratteristiche superficiali del biomateriale, quali principalmente:

- la rugosità superficiale: il sangue coagula preferenzialmente e più velocemente su superfici rugose, piuttosto che su superfici lisce. Dunque, per prevenire la coagulazione e facilitare il distacco di

microscopiche formazioni trombotiche prima che queste raggiungano dimensioni pericolose, le superfici dei biomateriali per cui è previsto un contatto diretto con il sangue vengono lucidate;

- la bagnabilità: il sangue coagula preferenzialmente su superfici idrofobe piuttosto che superfici idrofile, pertanto la bagnabilità è un'altra proprietà fisica da modulare per poter incrementare l'emocompatibilità di un biomateriale;
- la carica superficiale: il sangue coagula preferenzialmente su superfici elettropositive che elettronegative. Ciò è in parte dovuto al fatto che la parte corpuscolata, in particolare le piastrine, sono elettronegative e quindi vengono attratte da superfici elettropositive.

Ovviamente, il controllo del processo di coagulazione in seguito all'impianto di un dispositivo medico, si effettua anche tramite farmaci, quali l'eparina, avente effetti inibitori sul fibrinogeno, e gli antiaggreganti piastrinici.

Danno alla parte corpuscolata del sangue

Il possibile effetto nocivo sulla componente corpuscolata del sangue derivante dall'interazione con un materiale impiantato consiste, principalmente, nell'emolisi, termine con cui si indica il processo di distruzione dei globuli rossi. Questo processo è da evitare in quanto provoca il rilascio dell'emoglobina nel plasma, dove viene degradata metabolicamente, con la conseguente perdita della sua funzione di trasporto dell'ossigeno. Un altro rischio associato all'emolisi consiste nel possibile accumulo a livello renale dello stroma, ossia la membrana cellulare dei globuli rossi. In condizioni fisiologiche, lo stroma viene eliminato in seguito alla rottura della cellula, in quanto privo di funzionalità. Se l'emolisi interessa, però, un elevato numero di globuli rossi, il processo di eliminazione dello stroma potrebbe parzialmente bloccarsi, determinando problemi di intasamento a livello renale e quindi uno scorretto filtraggio del sangue.

Risulta, quindi, evidente l'importanza di evitare, o almeno ridurre, questo processo di danneggiamento della parte corpuscolata del sangue. A tale scopo vanno tenute ben presenti, in relazione all'impianto del dispositivo, le diverse cause alla base dell'emolisi; temperature superiori ai 42 °C favoriscono l'innescarsi di questo processo, così come elevati valori di pressione osmotica sullo stroma, elevati valori o cicliche applicazioni di sforzi di taglio o urti meccanici sulla componente corpuscolata. I possibili criteri di prevenzione dell'emolisi consistono, quindi, nel garantire, in seguito all'impianto, condizioni fluidodinamiche tali da minimizzare le sollecitazioni meccaniche sui vasi sanguigni.

La continua specializzazione delle applicazioni dei polimeri nei più diversi campi è principalmente dovuta alla costante introduzione sul mercato di nuovi materiali aventi proprietà mirate ed altamente specifiche, che consentono la sostituzione delle materie plastiche tradizionali non biodegradabili.

Questo risulta particolarmente vero in riferimento al campo biomedicale, caratterizzato attualmente dall'esigenza di nuovi materiali biodegradabili e biocompatibili, aventi proprietà specifiche in riferimento ad impieghi che richiedono alte prestazioni. In questo ambito, i poliesteri costituiscono una classe di polimeri davvero promettente, in quanto le variegate strutture chimiche che li caratterizzano permettono di soddisfare un'ampia gamma di esigenze. Proprietà migliorate e sempre più specifiche possono, inoltre, essere ottenute modificando opportunamente il polimero di base per copolimerizzazione, senza incrementi significativi dei costi.

Tra i poliesteri alifatici risultano già commercializzati per la realizzazione di dispositivi biomedicali l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA), il poli(ϵ -caprolattone) (PCL) e i loro copolimeri, gli unici approvati dalla Food and Drug Administration (FDA). Questi ultimi, tuttavia, risultano troppo rigidi per la realizzazione di dispositivi deputati alla rigenerazione dei tessuti molli e sono, inoltre, caratterizzati da un profilo di degradazione idrolitica non idoneo alle applicazioni che richiedono un riassorbimento del materiale in tempi lunghi.

Una valida alternativa a PGA, PLA e PCL può essere rappresentata dal poli(butilene 1,4-cicloesandicarbossilato) (PBCE), un omopolimero di grande interesse perché contiene nell'unità monomerica un anello alifatico, la cui stereochimica influenza fortemente le proprietà finali del materiale. In particolare, lo stereoisomero *trans* presenta una più spiccata tendenza a cristallizzare, essendo più simmetrico di quello *cis* (Berti *et al.*, 2008a; 2008b). La presenza in catena principale dell'anello alifatico conferisce al materiale un alto punto di fusione, una stabilità termica elevata, interessanti proprietà meccaniche e al contempo garantisce il mantenimento della biodegradabilità (Berti *et al.*, 2010). Inoltre, come riportato in letteratura (Berti *et al.*, 2008a), i poliesteri contenenti l'anello alifatico sono caratterizzati da buona resistenza a calore, luce e umidità.

Per contro però, l'eccessiva rigidità e la bassa velocità di biodegradazione lo rendono poco versatile e ne limitano notevolmente la gamma di possibili applicazioni. In quest'ottica, la copolimerizzazione è senza dubbio lo strumento più interessante per modulare e migliorare le proprietà del PBCE, senza andare a detrimento di quelle già soddisfacenti.

Mediante copolimerizzazione è infatti possibile ottenere una nuova classe di polimeri con un'ampia gamma di proprietà, modulabili in base a quantità e a distribuzione delle unità comonomeriche lungo la catena macromolecolare. Risulta, dunque, di cruciale importanza uno studio accurato e approfondito delle proprietà allo stato solido dei materiali sintetizzati, al fine di ottenere correlazioni proprietà-struttura che permettano il design di polimeri con caratteristiche *ad hoc* per le applicazioni desiderate.

Una strategia di copolimerizzazione molto impiegata, anche a livello industriale, è rappresentata dalla miscelazione reattiva (o *reactive blending*). Tramite questa strategia, mescolando due o più omopolimeri allo stato fuso in presenza di un opportuno catalizzatore, è possibile ottenere copolimeri con diversa architettura molecolare. Tale approccio risulta particolarmente vantaggioso sia per la sua economicità, sia per la completa assenza di solventi; inoltre, semplicemente variando il tempo di mescolamento, è possibile modulare la lunghezza dei blocchi, fino all'ottenimento di copolimeri con struttura statistica.

Il presente lavoro di ricerca si è focalizzato sulla sintesi e sulla caratterizzazione di nuovi poliesteri e copoliesteri alifatici a base di PBCE, tramite policondensazione (per l'ottenimento degli omopolimeri) e miscelazione reattiva (per la sintesi di copolimeri a blocchi e statistici).

Al fine di ridurre la rigidità e i tempi di degradazione del PBCE si è scelto di introdurre lungo la sua catena principale atomi di ossigeno e di realizzare copolimeri a composizione fissa (50% molare dei due omopolimeri di partenza), ma con diversa architettura molecolare (lunghezza dei blocchi variabile).

Il gruppo di ricerca presso il quale è stata svolta la presente tesi vanta, infatti, una notevole esperienza circa la modifica di poliesteri alifatici e/o aromatici tramite introduzione di eteroatomi in catena. Tale modifica può avere diversi effetti sulle proprietà allo stato solido del materiale:

- la temperatura di transizione vetrosa (T_g) può:
 - diminuire perché la catena polimerica diventa più flessibile;
 - aumentare, a causa di forti interazioni intercatena.

Il primo effetto prevale se gli eteroatomi vengono introdotti lungo la catena polimerica di un polimero rigido.

- il punto di fusione e la tendenza a cristallizzare diminuiscono, a causa di una riduzione della simmetria della catena;
- l'idrofilicità superficiale aumenta, poiché la maggiore elettronegatività degli atomi di ossigeno rispetto a quelli di carbonio comporta la formazione di legami polari C-O.

Un altro parametro che influenza significativamente le proprietà fisico-chimiche finali del materiale è la lunghezza dei blocchi: ad esempio, ci si aspetta che velocità di cristallizzazione e perfezione dei cristalli aumentino all'aumentare della lunghezza dei blocchi cristallizzabili.

L'attività di ricerca qui illustrata si è articolata nelle seguenti fasi:

- preliminare analisi bibliografica per conoscere gli sviluppi più recenti sull'argomento trattato;
- sintesi, tramite *reactive blending*, di copolimeri a blocchi PBCE-PDGCE, di medesima composizione ma differente lunghezza dei blocchi;
- stampaggio in film sottili dei polimeri sintetizzati mediante pressofusione;
- caratterizzazione molecolare dei campioni mediante risonanza magnetica nucleare (NMR) e cromatografia a permeazione su gel (GPC);
- caratterizzazione termica mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC) e analisi termogravimetrica (TGA);
- analisi diffrattometrica a raggi X;
- caratterizzazione meccanica dei campioni mediante prove a trazione;
- misure dell'angolo di contatto;
- studi di biodegradabilità idrolitica in condizioni fisiologiche;
- prove di biocompatibilità *in vitro*;
- analisi dei risultati ottenuti ed estrapolazione di correlazioni proprietà-struttura.

Il presente lavoro di tesi è stato svolto presso i laboratori del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali dell'Università di Bologna e presso i laboratori del Dipartimento di Biochimica, Morfologia e Biologia Molecolare.

3.1 Sintesi

3.1.1 Sintesi degli omopolimeri

I due omopolimeri di riferimento, il PBCE e il PDGCE, sono stati sintetizzati mediante reazioni di policondensazione in massa a due stadi.

La strumentazione impiegata per questa strategia di sintesi si compone di un reattore in vetro a tre colli da 250 mL, immerso in un bagno termostato contenente una miscela di sali inorganici fusi, che garantisce una temperatura uniforme lungo tutto il corso della reazione, una pompa da vuoto, il cui impiego facilita l'eliminazione delle specie a basso peso molecolare, un sistema di refrigerazione, che lascia ricadere i sottoprodotti della reazione in una trappola di raccolta, e un agitatore meccanico, con misuratore di *torque*. Il sistema che garantisce l'agitazione dei reagenti è formato da un albero motore dotato di un insieme di estensimetri in grado di misurare il momento torcente (*torque*) necessario a mantenere costante la velocità di rotazione dell'agitatore, fissata a 100 rpm. Inoltre, la testa del reattore viene avvolta in una fascia riscaldante per evitare la condensazione, e quindi la ricaduta nella miscela di reazione, dei prodotti di distillazione.

Le sintesi sono state condotte su piccola scala: i reagenti sono stati caricati nel sistema di reazione contemporaneamente al catalizzatore e quindi portati ad una temperatura superiore a quella di fusione.

Durante il primo stadio, condotto in atmosfera inerte, cioè sotto flusso controllato di azoto, e alla temperatura di 180 °C hanno luogo le reazioni di esterificazione diretta a partire da due reagenti: un diolo e un diacido. Si hanno, dunque, reazioni tra i gruppi -COOH e -OH , con la conseguente liberazione di specie a basso peso molecolare, acqua nel caso in esame, che sono distillate via al fine di spostare l'equilibrio della reazione verso i prodotti. In tutte le reazioni effettuate il glicole è stato impiegato in quantità superiore, pari al 20% molare, a quella stechiometrica. Tale modo di procedere risponde all'esigenza di avere, al termine della prima fase, oligomeri contenenti gruppi funzionali preferenzialmente di tipo -OH , che

reagiscono più facilmente nel secondo stadio rispetto ai gruppi terminali --COOH . Il catalizzatore utilizzato è il titanio tetrabutoossido ($\text{Ti}(\text{OBu})_4$), in quantità pari a 150 ppm di Ti per grammo di polimero teorico, non tossico in ambiente biologico ed estremamente funzionale, in quanto presenta un'elevata attività alle alte temperature e risulta in grado di catalizzare entrambi gli stadi del processo di sintesi.

Si dà inizio al secondo stadio quando almeno il 90% del metanolo previsto dalla stechiometria di reazione si è raccolto, tramite distillazione, nella trappola (circa 2 ore dopo l'inizio del processo). In questo stadio avvengono le reazioni di transesterificazione, che determinano la formazione di catene polimeriche ad alto peso molecolare, con un conseguente incremento della viscosità del fuso. Durante questa fase della reazione, per favorire la distillazione del diolo in eccesso, si lavora sotto vuoto dinamico: si procede con un graduale decremento della pressione nel reattore fino ad un minimo di 0,1 mbar. Per lo stesso motivo, la temperatura viene lentamente innalzata fino ai 250 °C e poi mantenuta costante fino al termine della reazione.

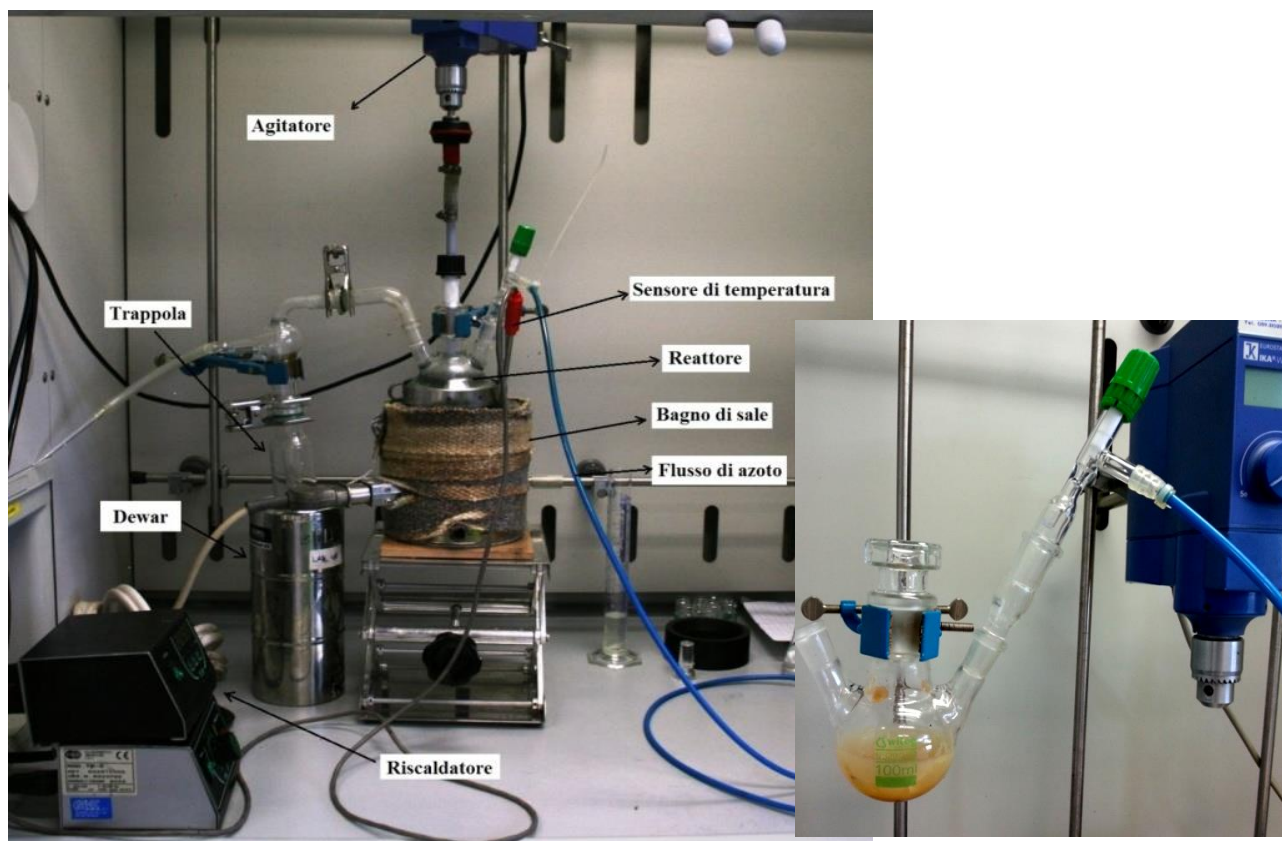


Fig. 3.1 Strumentazione impiegata per le reazioni di policondensazione.

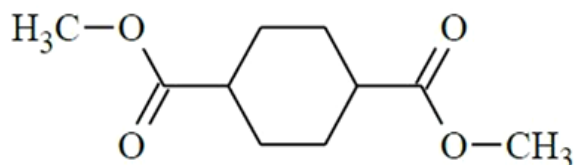
Per verificare, in questo secondo stadio, che le reazioni di transesterificazione stiano effettivamente avendo luogo ci si basa sulla lettura del *torque*, cioè il momento torcente che deve essere imposto dal motore all'agitatore per mantenerne costante il numero di giri al minuto. Infatti, dato che al procedere della polimerizzazione si ha un aumento della viscosità del composto, l'agitatore incontra progressivamente una

maggior resistenza, e quindi, affinché questo continui a compiere lo stesso numero di giri nell'unità di tempo, è necessario che aumenti lo sforzo meccanico del motore, cioè il *torque*. Pertanto quando questo, dopo essere aumentato, inizia a stabilizzarsi su un determinato valore costante si ha evidenza del fatto che la viscosità del polimero non sta ulteriormente incrementando: ciò indica che si è raggiunto un equilibrio tra le reazioni di crescita e di rottura delle catene polimeriche. A questo punto si considera concluso il processo di sintesi.

I reagenti utilizzati per la sintesi degli omopolimeri oggetto della presente tesi sono stati acquistati presso Sigma Aldrich (Milano). Tutti i monomeri impiegati non sono stati sottoposti ad un'ulteriore purificazione, mentre il titanio tetrabutossido è stato distillato prima dell'uso.

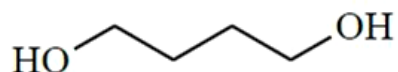
Le strutture chimiche dei reagenti utilizzati sono le seguenti:

- per la sintesi di entrambi gli omopolimeri è stato impiegato il dimetil *trans*-cicloesano-1,4-dicarbossilato (DMCED):

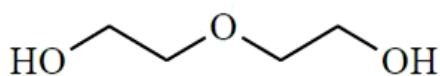


I due omopolimeri si differenziano per il diolo;

- nel caso del PBCE si impiega il 1,4-butandiolo (BD):

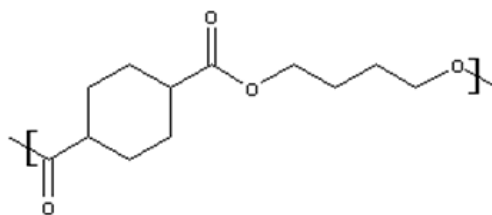


- nella sintesi del PDGCE il diolo impiegato è il dietilenglicole (DEG):

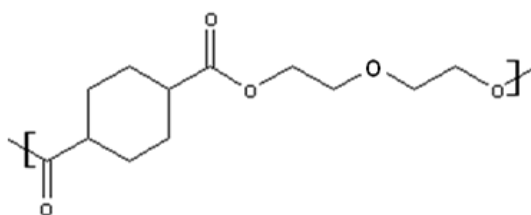


Di seguito sono riportate le strutture chimiche degli omopolimeri ottenuti;

- Poli(butilene 1,4-cicloesandicarbossilato), PBCE:

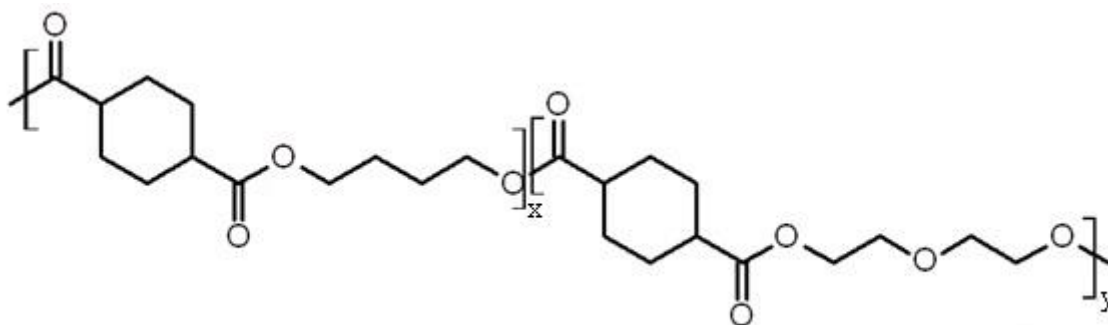


- Poli(dietilene 1,4-cicloesandicarbossilato), PDGCE:



3.1.2 Sintesi dei copolimeri, *reactive blending*

Di seguito è riportata la struttura dei copoliesteri ottenuti, chiamati $P(BCE_x DGCE_y)$, dove x e y indicano la lunghezza media dei blocchi di ciascuna unità comonomerica.



I copolimeri multi-blocchi sono stati sintetizzati per mezzo di miscelazione reattiva. Il nostro obiettivo, in fase di sintesi, è stato quello di ottenere campioni caratterizzati da una diversa lunghezza media dei blocchi, così da poter valutare, nella successiva fase di caratterizzazione, come tale parametro influenzasse le proprietà dei materiali ottenuti. A tale scopo è stato necessario mantenere fissa la composizione chimica dei vari campioni, in modo da mettere in evidenza l'incidenza della sola lunghezza dei blocchi, e non di altri parametri, sulle proprietà del materiale. Il rapporto molare dei due omopolimeri è stato, quindi, mantenuto costante e pari a 1:1; la composizione di partenza della sintesi è pertanto equimolare.

La miscelazione reattiva prevede la combinazione di due (o più) polimeri, sotto flusso controllato di azoto e a temperatura superiore a quella di fusione dei due omopolimeri di partenza. La realizzazione dell'atmosfera inerte evita l'innescarsi di reazioni di ossidazione che degraderebbero il copolimero in formazione. Va tenuto presente che anche l'elevata temperatura rappresenta un fattore che favorisce i processi di degradazione, termica in tal caso, e quindi va accuratamente modulata, in modo che risulti superiore al punto di fusione dei reagenti ma certamente inferiore alla loro temperatura di stabilità chimica.

Gli omopolimeri, al termine della loro sintesi, non sono stati purificati in modo tale che il catalizzatore usato durante la loro policondensazione permanesse all'interno della loro struttura; tale catalizzatore può così essere ulteriormente sfruttato nel *reactive blending*, durante il quale va a promuovere le reazioni di transesterificazione, cioè di scissione delle catene degli omopolimeri, le quali, una volta segmentate, si ricombinano tra loro formando la struttura a blocchi del copolimero.

Per ottenere strutture con diversa lunghezza dei blocchi è stato necessario agire sul tempo di reazione. Infatti, all'aumentare del tempo di reazione si verifica nel composto un maggior numero di reazioni di transesterificazione e di conseguenza diminuisce la lunghezza dei blocchi di ciascun omopolimero, fino all'ottenimento di campioni statistici.

La strumentazione impiegata per il *reactive blending* è analoga a quella sfruttata per la policondensazione degli omopolimeri; il reattore in vetro a tre colli da 200 mL viene immerso in un bagno termostato di olio di silicone, attraverso cui è stata imposta al sistema una temperatura di 230 °C; prove preliminari, condotte a diverse temperature, hanno permesso di individuare questo valore ottimale, al quale le reazioni di transesterificazione avvengono ad una velocità tale da permettere l'ottenimento di copoliesteri con blocchi di diversa lunghezza, evitando fenomeni di termodegradazione significativi. A tale temperatura, in circa 10 minuti, gli omopolimeri giungono a completa fusione. A questo punto è stato messo in funzione l'agitatore meccanico ad una velocità pari a 100 rpm. Durante il corso della reazione la temperatura effettiva nel reattore è stata costantemente monitorata attraverso un termometro inserito nel bagno di olio di silicone.

Come detto, al fine di ottenere una diversa lunghezza dei blocchi per ciascun campione di copolimero, durante la loro sintesi è stato modulato il tempo di reazione, in un intervallo che va dai 30 ai 300 minuti: si sono così ottenute strutture a blocchi di lunghezza variabile e compresa tra 20 e 2 (copolimero statistico).

Grazie alla successiva caratterizzazione molecolare dei campioni tramite risonanza magnetica nucleare è stato possibile ricavare la corrispondenza tra i tempi di reazione e la lunghezza media dei blocchi illustrata in tabella 3.1.

Tabella 3.1 Tempi di reazione corrispondenti ai cinque campioni sintetizzati.

tempo di reazione (min)	lunghezza media dei blocchi	copolimero
30	20	P(BCE ₂₀ DGCE ₂₀)
50	11	P(BCE ₁₁ DGCE ₁₁)
120	7	P(BCE ₇ DGCE ₇)
220	4	P(BCE ₄ DGCE ₄)
300	2	P(BCE ₂ DGCE ₂)

3.2 Stampaggio in film

L'omopolimero PBCE e i campioni di copolimero, semicristallini, sono stati sottoposti a pressofusione per ottenerne film sottili, di spessore pari a 0.2 mm circa, utilizzando una pressa con piastre in alluminio riscaldate e un sistema di raffreddamento ad acqua (Carver Laboratory Press). Non è stato possibile stampare il PDGCE, in quanto a temperatura ambiente si presenta come una gomma (solido amorfo con T_g ben al di sotto dei 20°C, vedi capitolo 4).

Ciascun campione è stato posto tra due strati di Teflon; tra questi è stata inserita anche una maschera di alluminio teflonato con la funzione di garantire uno spessore uniforme dei film. La temperatura impostata per ciascuna pressofusione è superiore di 40 °C alla T_m del polimero in lavorazione. Una volta fuso, il materiale subisce l'effetto della pressione applicata tramite la pressa (circa 1,5 MPa) per 2 minuti; successivamente le piastre, mantenute in pressione, vengono raffreddate con acqua a 10 °C per circa 20 minuti, in modo da garantire una veloce solidificazione del campione nella nuova forma.

Prima della caratterizzazione, i film polimerici così ottenuti sono stati lasciati a temperatura ambiente per almeno due settimane permettendo ai polimeri di sviluppare il massimo grado di cristallinità ottenibile in condizioni ambientali.

3.3 Caratterizzazione molecolare

3.3.1 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, NMR

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare è una tecnica analitica strumentale che permette di ottenere dettagliate informazioni sulla composizione e sulla struttura molecolare dei materiali in esame.

Questa tecnica sfrutta il principio per cui i nuclei di alcuni elementi, se sottoposti ad un campo magnetico esterno, intenso e stazionario, si orientano nella stessa direzione di tale campo. Questo fenomeno è osservabile solo se l'atomo possiede momento magnetico nucleare di spin non intero: in tal caso i nuclei, ruotando, danno origine ad un campo magnetico elementare che li rende simili a piccoli magneti. Gli atomi tipicamente usati per l'analisi NMR sono ^1H e ^{13}C , dotati di spin pari a $1/2$.

Dunque, quando un nucleo dotato di spin viene immerso in un campo magnetico, esso, come l'ago di una bussola, è sottoposto ad una coppia di forze che lo fa ruotare al fine di allinearlo col campo esterno. Le possibili orientazioni che il nucleo può assumere, allineandosi con il campo magnetico, sono governate dal numero quantico m . Per un nucleo con spin $1/2$, sono due gli orientamenti permessi: quello parallelo al campo, con $m=+1/2$, e quello antiparallelo, con $m=-1/2$. I due possibili stati del nucleo non hanno la stessa energia: lo stato con $m = +1/2$, parallelo al campo, si trova ad energia leggermente più bassa di quello con $m = -1/2$, avente verso opposto al campo.

Il momento magnetico nucleare μ , in seguito all'allineamento del nucleo, non rimane fermo, ma continua ad oscillare attorno alla direzione del campo magnetico applicato B_0 , compiendo un moto di precessione simile a quello di una trottola, come osservabile nella seguente figura.

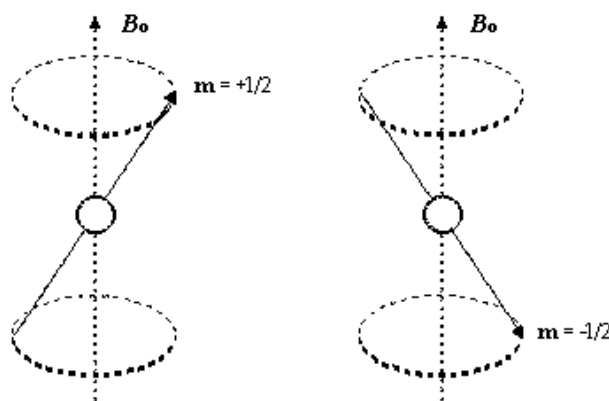


Fig. 3.2 Possibili orientamenti dei nuclei di ^1H e ^{13}C in presenza di campo magnetico.

Il moto di precessione dei momenti magnetici nucleari avviene con una frequenza proporzionale alla differenza di energia tra i due livelli, detta frequenza di Larmor e data dalla formula:

$$\nu = \gamma \cdot \frac{B_0}{2\pi}$$

dove γ è il rapporto giromagnetico, dipendente dal nucleo in esame.

All'aumentare dell'intensità del campo magnetico applicato, B_0 , aumenta la differenza di energia tra i due livelli. Poiché, però, questa differenza di energia è, in ogni caso, piccolissima (dell'ordine di $9 \cdot 10^{-6}$ kcal/mol), la popolazione di nuclei nei due stati è praticamente identica, con una leggerissima prevalenza per lo stato a bassa energia, allineato con il campo. Basti pensare che, nel caso dei nuclei di idrogeno ^1H , a temperatura ambiente, in un campo magnetico di 1,41 T ($\nu (^1\text{H}) = 60 \text{ MHz}$) si ha un solo nucleo in più nello stato di bassa energia ogni duecentomila nuclei. Eppure sono proprio questi pochi nuclei in eccesso allineati con il campo magnetico B_0 quelli che permettono di generare il segnale NMR, in quanto fanno sì che la risultante di tutti i momenti magnetici nucleari sia diversa da zero ed assimilabile a un vettore, di debole intensità, allineato con il campo magnetico primario B_0 .

Se il campione viene irradiato con una radiazione elettromagnetica di frequenza uguale alla frequenza di Larmor dei nuclei in esame, ad esempio ^1H , si ha un'interazione della componente magnetica della radiazione con i momenti magnetici nucleari, oscillanti alla frequenza di Larmor. L'energia della radiazione può così essere trasferita ai nuclei. Ogni assorbimento di radiazione comporta un cambiamento di orientazione dello spin nucleare, in rotazione, da allineato con il campo ad opposto al campo. Quando si verifica questa transizione di spin, si dice che i nuclei sono in risonanza con la radiazione applicata, da qui il nome di risonanza magnetica nucleare. Dunque, il passaggio di un nucleo da un'orientazione all'altra è possibile tramite l'assorbimento di una quantità di energia pari a:

$$E = h \nu = 2\mu B_0$$

dove h è la costante di Planck e ν è la frequenza della radiazione elettromagnetica assorbita, cioè la frequenza di Larmor.

Nei moderni strumenti FT-NMR il segnale NMR viene generato con il metodo ad impulso e acquisito sfruttando la trasformata di Fourier. Con questa tecnica tutti i nuclei di una specie vengono eccitati contemporaneamente da un impulso a radiofrequenza che contiene tutto l'intervallo di frequenze necessario; i dati vengono poi elaborati al computer con la tecnica della trasformata di Fourier.

Quando si interrompe l'impulso della radiazione elettromagnetica i nuclei eccitati continuano ad emettere per qualche istante un debole segnale di radiofrequenza che si spegne nel tempo, come una sorta di eco del segnale assorbito. Per registrare questo segnale entra in funzione un circuito ricevente. Il segnale raccolto è un segnale oscillante con frequenza ν , la frequenza di Larmor del nucleo in esame, che si smorza nel tempo e che viene detto FID (free induction decay), libero decadimento dell'induzione. Nel grafico FID la frequenza d'oscillazione è facilmente individuabile misurando la lunghezza d'onda (cioè la distanza tra due creste successive, che rappresenta il periodo dell'onda) e applicando la formula:

$$\nu = \frac{1}{\lambda}$$

dove λ è la lunghezza d'onda. A partire da questo grafico in funzione del tempo, il FID, si ottiene così un nuovo grafico in funzione delle frequenze, chiamato spettro NMR, che mostra la frequenza assorbita dagli atomi in esame, ad esempio quelli di idrogeno.

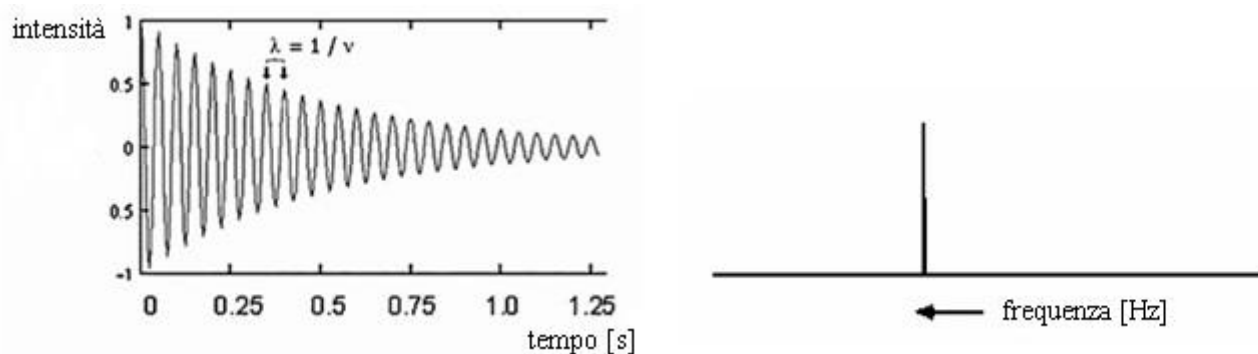


Fig. 3.3 Semplice esempio di grafico FID e corrispondente spettro NMR.

Esaminato il principio di funzionamento alla base di questa tecnica, deve, inoltre, essere tenuto presente il fatto che il segnale NMR di un certo nucleo risulta spostato nello spettro, a frequenze più alte o più basse, a seconda del suo intorno chimico; ciò accade perché gli elettroni sono particelle cariche e, in quanto tali, se immersi in un campo magnetico, si muovono generando un campo magnetico secondario, opposto ad esso. Questo campo magnetico secondario scherma il nucleo dalla piena forza del campo applicato e tanto più grande è la densità elettronica, tanto maggiore sarà questo effetto di schermatura; di conseguenza, i nuclei che si trovano in un intorno ricco di elettroni percepiranno un campo magnetico meno intenso e saranno quindi caratterizzati da una minore frequenza di Larmor, cioè subiranno la transizione ad una frequenza applicata più bassa rispetto ai nuclei situati in intorni poveri di elettroni. In particolare, questo effetto dipende dal fatto che gli elettroni di legame possono trovarsi più vicini o più lontani dall'atomo in esame a seconda dell'elettronegatività dell'altro atomo legato; in generale, protoni o carboni adiacenti ad atomi più elettronegativi risultano deschermati e di conseguenza avvertono un campo magnetico applicato più intenso, subiscono pertanto la transizione a frequenze maggiori e, nello spettro NMR, si trovano ad uno spostamento chimico più alto.

Per spostamento chimico si intende lo spostamento risultante del segnale NMR per un dato nucleo ed è definito come la differenza tra la frequenza (in Hz) del segnale NMR del nucleo in esame e quella del tetrametilsilano (TMS), preso come riferimento; dunque, nel caso di ^1H -NMR:

$$\text{spostamento chimico assoluto} = \text{Hz} (H_{\text{misurato}}) - \text{Hz} (H_{\text{TMS}})$$

Per convenzione, infatti, sia per ^1H -NMR che per ^{13}C -NMR, lo zero della scala degli spostamenti chimici è attribuito all'assorbimento NMR del TMS, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, nel quale gli idrogeni e i carboni sono più fortemente schermati di quanto si osserva nella maggior parte delle altre molecole organiche, le quali, quindi, presentano sempre spostamenti chimici positivi.

Lo spostamento chimico assoluto risulta tanto maggiore quanto più grande è il campo applicato; quindi strumenti diversi forniscono spostamenti chimici assoluti diversi in relazione all'intensità del loro campo

magnetico. Per questo motivo si preferisce fornire i risultati in termini di spostamento chimico relativo, δ , definito dall'equazione:

$$\delta = \frac{\text{Hz (H}_{\text{misurato}}) - \text{Hz (H}_{\text{TMS}})}{\text{MHz (H}_{\text{TMS}})}$$

In questo modo lo spostamento chimico δ , misurato in ppm (Hz/MHz), è indipendente dall'intensità del campo magnetico applicato e quindi uguale per tutti gli strumenti. Tipicamente per il nucleo dell'atomo ^1H , e per gran parte delle molecole organiche, δ è compreso nell'intervallo tra 0 e 10 ppm, mentre per ^{13}C -NMR è molto più esteso e copre l'intervallo 0-220 ppm.

Lo spettro ^1H -NMR consente di verificare la composizione chimica del materiale. Infatti, una sua caratteristica è il fatto che l'intensità del segnale risulta proporzionale al numero di idrogeni che generano il segnale stesso; ovvero, l'area sottesa da un certo picco è direttamente proporzionale al numero di quel tipo di idrogeni nella molecola. Poiché, a causa dell'effetto di schermatura degli elettroni, in uno spettro ^1H -NMR, ad atomi di idrogeno con intorni chimici (reticoli) diversi corrispondono picchi diversi, considerando l'area sottesa da ogni picco e valutandola in termini relativi (in termini assoluti perde di valore dato che varia a seconda della concentrazione della soluzione), risulta possibile determinare il rapporto tra i vari tipi di atomi di idrogeno presenti nel materiale. L'area di un picco è, infatti, indipendente dalla struttura a cui è legato l'atomo di idrogeno, dato che dipende unicamente dalla frequenza con cui tale atomo si ripete all'interno della molecola. Dividendo poi l'area di ogni picco per il numero di idrogeni a cui corrisponde, si ottengono valori perfettamente confrontabili con quelli dati dalla formula chimica del polimero analizzato. In questo modo è stata verificata la composizione degli omopolimeri. Analogamente, la composizione di ogni copolimero (espressa in % di unità BCE) si ricava dal rapporto tra le aree dei picchi relativi agli atomi di idrogeno presenti nelle subunità tipiche di ciascuno dei due omopolimeri.

Tramite l'elaborazione degli spettri ^1H -NMR è, inoltre, possibile ricavare informazioni relative all'isomeria del materiale analizzato, in termini di % di unità *trans* di ciascun copolimero. Infatti, pur avendo impiegato per la sintesi un monomero con conformazione 100% *trans*, è stato osservato come il processo di policondensazione, condotto ad elevate temperature, potrebbe innescare processi di isomerizzazione.

Nel caso specifico del presente lavoro, lo spettro ^{13}C -NMR è stato utile al fine di verificare la lunghezza dei blocchi che caratterizza la struttura di ciascun copolimero sintetizzato; infatti, questo spettro è stato ricavato solamente per i campioni copolimerici, mentre per gli omopolimeri ci si è limitati all'analisi NMR al protone.

Il nostro obiettivo, in fase di sintesi, è stato quello di ottenere campioni di $\text{P(BCE}_x\text{DGCE}_x)$ caratterizzati da diverse lunghezze dei blocchi, al fine di valutare, tramite la successiva caratterizzazione, l'incidenza di tale parametro strutturale sulle proprietà del materiale. I tempi di reazione durante il reactive blending sono stati, quindi, modulati in modo tale da ottenere, circa, le seguenti lunghezze dei blocchi: 2, 4, 7, 11, 20. Con l'analisi NMR al carbonio abbiamo potuto verificare che effettivamente le strutture ottenute fossero

caratterizzate da tali lunghezze medie dei blocchi di comonomeri. Le informazioni relative all'architettura molecolare dei copolimeri sono state dedotte per ogni campione dal corrispondente grado di statisticità b , determinato in base allo spettro ^{13}C -NMR: è stato, infatti, dimostrato che questo indice è pari a 1 per i copolimeri statistici, pari a 2 per quelli alternati, compreso tra 0 e 1 per i copolimeri a blocchi e tendente a 0 per le miscele fisiche (Soccio *et al.*, 2012). Il calcolo di b è stato effettuato tenendo in considerazione i picchi di risonanza degli atomi di carbonio delle subunità comuni alle due unità comonomeriche (X e Y) e può essere espresso come:

$$b = P_{X-Y} + P_{Y-X}$$

dove P_{X-Y} e P_{Y-X} sono, rispettivamente, le probabilità di trovare un'unità X vicino a una Y e un'unità Y vicino a una X. Queste possono essere ricavate come segue:

$$P_{X-Y} = \frac{\frac{(I_{X-Y} + I_{Y-X})}{2}}{\frac{(I_{X-Y} + I_{Y-X})}{2} + I_{X-X}}$$

ed, equivalentemente, la probabilità che l'unità comonomerica Y sia affiancata da una di tipo X:

$$P_{X-Y} = \frac{\frac{(I_{Y-X} + I_{X-Y})}{2}}{\frac{(I_{Y-X} + I_{X-Y})}{2} + I_{Y-Y}}$$

dove I_{X-X} , I_{Y-Y} , I_{X-Y} e I_{Y-X} rappresentano l'integrale dell'intensità del segnale di risonanza, rispettivamente, delle sequenze X-X, Y-Y, X-Y, Y-X.

Dal reciproco delle due probabilità si ottiene la lunghezza media dei blocchi, dell'una e l'altra co-unità, che compongono le macromolecole del campione:

$$L_X = \frac{1}{P_{X-Y}}; \quad L_Y = \frac{1}{P_{X-Y}}$$

Gli spettri sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro NMR Varian INOVA 400MHz. Le soluzioni da analizzare sono state preparate sciogliendo circa 10 mg di polimero in cloroformio deuterato, CDCl_3 , contenente lo 0,03% di tetrametilsilano (TMS), utilizzato come standard interno. Gli spettri al protone sono stati acquisiti a temperatura ambiente su soluzioni con concentrazione di polimero pari allo 0,5 wt% (con tempo di rilassamento di 1 s, tempo di acquisizione pari a 1 s per 64 ripetizioni). Gli spettri ^{13}C -NMR sono stati ricavati da soluzioni con concentrazione di polimero pari al 5 wt% in condizioni di disaccoppiamento totale dal protone (con tempo di rilassamento pari a 2 s, tempo di acquisizione pari a 1 s per 512 ripetizioni).

3.3.2 Cromatografia a permeazione su gel, GPC

La cromatografia a permeazione su gel è una tecnica di separazione fisica che consente di determinare la distribuzione del peso molecolare di un polimero.

Questo metodo di analisi si basa sulla creazione di curve di taratura attraverso standard costituiti da polimeri a peso molecolare noto e sulla successiva analisi del campione incognito per confronto. La strumentazione necessaria si compone di una pompa volumetrica, una colonna caricata con un riempitivo poroso e un rivelatore.

Durante la scansione in colonna viene fatto circolare un solvente con portata volumetrica costante. I campioni da analizzare vengono sciolti nello stesso solvente circolante in colonna e filtrati attraverso l'utilizzo di un'apposita siringa, al fine di eliminare eventuali particelle estranee non solubili che potrebbero ostruire i pori del riempitivo; le soluzioni filtrate vengono quindi iniettate nello strumento e fatte eluire all'interno della colonna.

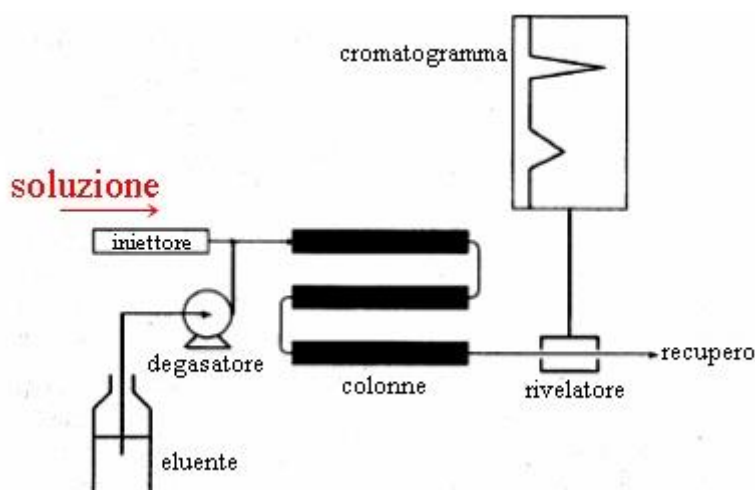


Fig. 3.4 Schematizzazione del cromatografo.

La separazione fisica avviene grazie al cosiddetto principio del 'setaccio molecolare': la possibilità di distinguere i diversi pesi molecolari è, cioè, dovuta al fatto che le molecole più grandi non penetrano nei pori, limitandosi ad aggirare i corpi di riempimento, mentre le molecole più piccole riescono a penetrare nei pori del riempimento e pertanto, attraversando le varie porosità che incontrano, compiono un percorso più lungo per uscire dalla colonna; di conseguenza, le molecole ad alto peso molecolare usciranno in tempi brevi dalla colonna, al contrario, quelle a basso peso molecolare impiegheranno più tempo, ossia: il soluto che scorre all'interno della colonna con riempimento poroso subisce un rallentamento proporzionale alle dimensioni delle particelle che lo costituiscono. Grazie a questa proporzionalità, dalla misura dei tempi di eluizione e dal confronto di questi con quelli degli standard di taratura, è possibile stimare la distribuzione del peso molecolare di campioni polimerici.

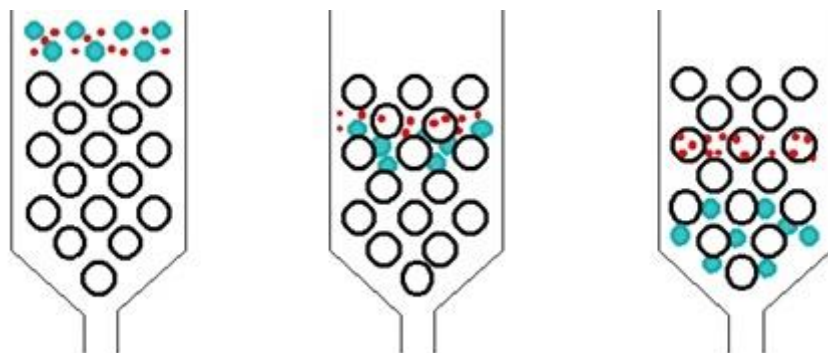


Fig.3.5 Schematizzazione del meccanismo di separazione molecolare.

La soluzione in uscita dalla colonna viene analizzata da un sensore che fornisce, istante per istante, un segnale la cui intensità è proporzionale alla concentrazione del soluto. Il risultato dell'analisi GPC è un grafico che riporta l'andamento di tale segnale in funzione del tempo di eluizione; per convertire i tempi di eluizione in pesi molecolari, come detto, è necessario far riferimento alle curve di taratura, ottenute analizzando campioni standard, di peso molecolare noto.

Le misure GPC sono state effettuate alla temperatura di 30 °C mediante un cromatografo HP Series 1100 equipaggiato con una colonna PL gel 5 μ m MiniMIX-C (rapporto lunghezza/diametro interno 250mm/4.6mm) e di un rivelatore a indice di rifrazione (IR). Il riempitivo presente nella colonna utilizzata è il polistirene reticolato con divinilbenzene. Come eluente è stato impiegato il cloroformio puro, con flusso in colonna pari a 0,3 mL/min, precedentemente filtrato e fatto fluire attraverso un degasatore, al fine di rimuovere le particelle gassose che, analogamente a quelle non solubili, potrebbero ostruire i pori del gel. I campioni da iniettare nello strumento sono stati preparati disciogliendo 2 mg di ciascun polimero in 1 mL di cloroformio. Per ottenere le curve di taratura sono stati impiegati vari standard di polistirene di peso molecolare variabile tra 1940 e 96000. Il software associato al cromatografo calcola automaticamente, in base alla distribuzione ottenuta, il peso molecolare medio numerico e ponderale e l'indice di polidispersità del campione.

3.4 Caratterizzazione termica

3.4.1 Termogravimetria, TGA

L'analisi termogravimetrica permette di evidenziare le variazioni di peso di un campione di materiale in funzione della temperatura, sottoponendolo ad un riscaldamento programmato in atmosfera controllata (N_2 , O_2 , aria). I cambiamenti di peso sono dovuti a perdite di sostanze volatili in seguito al verificarsi di processi fisici o chimici, causati dalla variazione di temperatura, i quali modificano la natura del composto.

Questa tecnica dà quindi informazioni in merito alla stabilità termica del materiale polimerico ed è necessaria per conoscere l'intervallo di temperatura al quale il polimero può essere mantenuto senza subire degradazione termica.

Lo strumento utilizzato è la termobilancia TGA 4000 della Perkin-Elmer: un braccio della bilancia porta un piattello su cui viene posta una quantità di campione da analizzare compresa tra 5 e 7 mg, il quale viene poi inserito all'interno di una fornace; l'altro braccio della bilancia contiene un piattello che funge da riferimento. La procedura utilizzata per l'analisi dei vari polimeri prevede un riscaldamento da temperatura ambiente fino a 900 °C, ad una velocità di 10 °C/min, sotto flusso di azoto pari a 40 mL/min. Lo strumento è collegato ad un calcolatore sul quale viene impostato l'intervallo di temperatura a cui effettuare l'analisi termogravimetrica e la velocità di scansione. Il termogramma in uscita, anche detto curva di decomposizione termica, riporta la variazione percentuale di peso all'aumentare della temperatura e la corrispondente funzione derivata in ogni punto. Nel caso dei materiali polimerici i prodotti di decomposizione sono prevalentemente anidride carbonica e acqua e la curva termogravimetrica ha l'andamento tipico illustrato in figura 3.6.

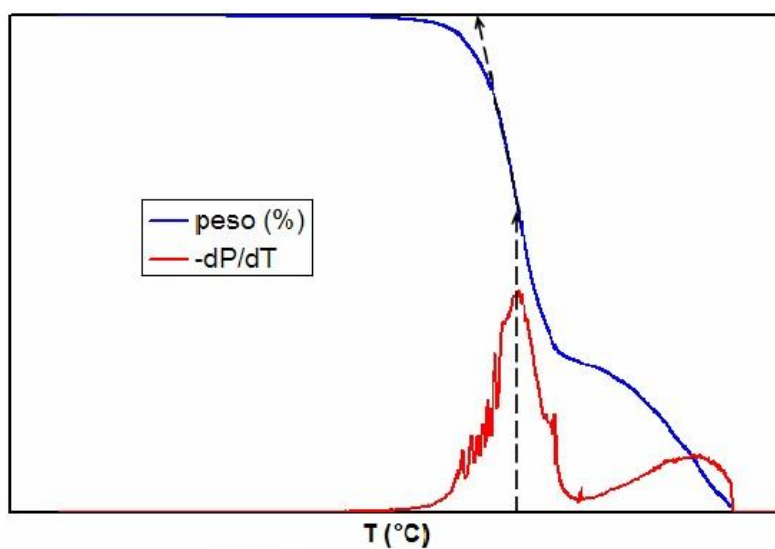


Fig. 3.6 Esempio di curva termogravimetrica e determinazione della temperatura di T_{max} .

Per poter confrontare quantitativamente la stabilità termica di diversi campioni è necessario fissare un criterio per determinare in modo univoco, in base alla curva termogravimetrica ottenuta, la temperatura di inizio degradazione.

Nella presente tesi, per individuare il range di stabilità termica dei campioni, sono state considerate la temperatura a cui corrisponde la perdita di peso pari al 5% ($T_{5\%,loss}$) e la temperatura corrispondente alla massima velocità di perdita di peso (T_{max}).

3.4.2 Calorimetria differenziale a scansione, DSC

La calorimetria differenziale a scansione è una tecnica che consente di studiare le transizioni termiche dei materiali e di determinarne le proprietà termodinamiche, in particolare la temperatura di transizione vetrosa, la temperatura di fusione e i corrispondenti calori, nonché i valori della temperatura e dell'entalpia legati al processo di cristallizzazione

Per ricavare queste informazioni si procede riscaldando o raffreddando in maniera controllata il materiale da analizzare. Il principio di funzionamento di questa tecnica si basa sulla misura della differenza di flusso termico tra il campione in esame e uno di riferimento, mentre ai due viene imposta la medesima temperatura, variabile secondo un programma prestabilito. Le misure sono state effettuate con un calorimetro a flusso di calore Pyris DSC-6 (Perkin-Elmer), fornito di accessori per il raffreddamento (Intracooler), fino a temperature pari a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, e calibrato con standard ad elevata purezza, quali indio e fenantrene. Come osservabile dalla seguente figura, la strumentazione prevede due piatti dedicati all'alloggiamento di altrettante capsule (in alluminio, da $40\text{ }\mu\text{L}$), contenenti il campione (in quantità compresa tra 5-10 mg) ed il riferimento, nel nostro caso una capsula vuota. Le celle calorimetriche che contengono tali capsule costituiscono dei microcalorimetri, mantenuti in atmosfera inerte durante le misure (con flusso d'azoto costante e pari a 20 mL/min) e sottoposte allo stesso programma termico. Pertanto, in assenza di transizioni di fase, campione e riferimento si trovano alla stessa temperatura; al contrario, quando queste hanno luogo, è rilevabile il configurarsi di uno squilibrio termico: le transizioni di fase comportano, infatti, una variazione di entalpia o di capacità termica. La conseguente differenza di temperatura viene letta da termoresistenze e quindi trasdotta in flusso di calore. Queste consentono, infatti, di controllare la potenza elettrica fornita ai microcalorimetri: tale flusso di energia è predisposto al fine di annullare la differenza di temperatura tra campione e riferimento. Il computer interfacciato al calorimetro permette sia di impostare il programma termico, sia di rilevare ed elaborare i dati, forniti dallo strumento sottoforma di curva calorimetrica; questa riporta, in funzione della temperatura, il flusso di energia, cioè di calore, tale appunto da annullare, istante per istante, lo squilibrio termico tra campione e riferimento.

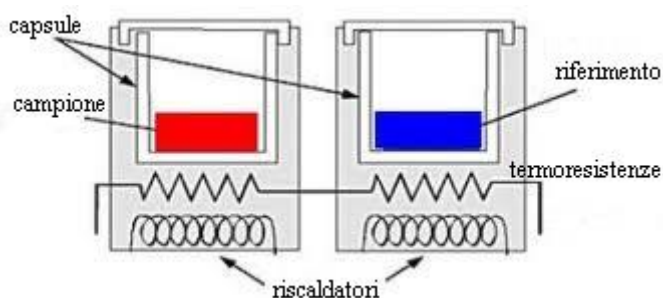


Fig. 3.7 Schematizzazione della strumentazione DSC.

Una delle proprietà termodinamiche ricavabili attraverso analisi DSC è la temperatura di transizione vetrosa. La T_g è un parametro caratteristico dei solidi polimerici, rappresentante la soglia termica alla quale si verifica il passaggio dallo stato solido rigido e vetroso ad uno stato gommoso e viscoso. La transizione vetrosa, specialmente nel caso di polimeri amorfi, non avviene in modo netto e, nel tracciato DSC, si manifesta come una variazione endoterma della linea di base; il valore esatto della T_g viene individuato in corrispondenza della metà della variazione di calore specifico associata a tale transizione.

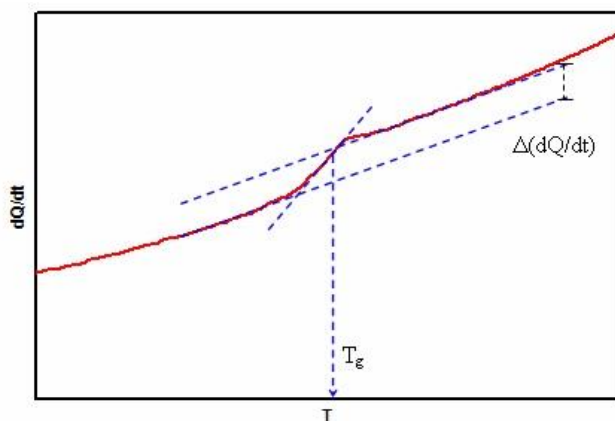


Fig. 3.8 Determinazione della temperatura di transizione vetrosa in base alla curva calorimetrica.

L'entità della variazione di calore specifico associata alla transizione vetrosa, proporzionale alla componente amorfa presente nel materiale, è pari alla distanza verticale tra le linee di base estrapolate alla T_g :

$$\Delta c_p = \Delta \left(\frac{dQ}{dT} \right)_p = \Delta \left(\frac{dQ}{dt} \right) \cdot \left(\frac{dT}{dt} \right)^{-1}$$

dove $\left(\frac{dT}{dt} \right)$ indica la velocità di scansione impostata nel programma.

La temperatura di fusione è un'altra delle proprietà termodinamiche evidenziabili sul tracciato DSC. La T_m rappresenta la soglia termica alla quale si verifica il passaggio dallo stato solido allo stato liquido, interpretabile come una transizione termodinamica del primo ordine che, nel tracciato DSC, si presenta come un picco endotermico. Il valore di T_m si individua nell'ascissa di tale picco, mentre l'area sottesa da esso, proporzionale al grado di cristallinità del polimero, corrisponde al calore di fusione ΔH_m (J/g). Il rapporto tra quest'ultima grandezza ed il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità, parametro la cui conoscenza rende possibili confronti tra il modulo di elasticità di diversi campioni. Quando nella curva DSC si osservano molteplici picchi endotermici, si individua come temperatura di fusione quella corrispondente al picco a temperatura più alta.

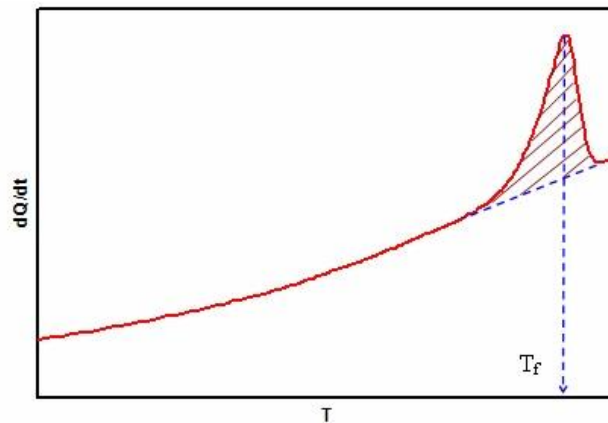


Fig. 3.9 Determinazione della temperatura di fusione sulla curva calorimetrica.

Dal tracciato DSC può essere ricavata anche la temperatura di cristallizzazione (T_{cc}): questa si manifesta come un picco esotermico; il corrispondente calore è dato dall'area sottesa da tale picco.

Al fine di misurare le temperature di fusione e di transizione vetrosa dei polimeri oggetto di studio, il campione e il riferimento (una capsula di alluminio vuota) sono stati collocati nelle apposite celle calorimetriche e sottoposti al seguente programma:

- I scansione: riscaldamento dei campioni, alla velocità di 20 °C/min, da -65 °C fino a un valore di temperatura di almeno 40 °C superiore alla T_m del polimero (in prima analisi, 210 °C, cioè pari alla T_m del PBCE + 40 °C).
- II scansione: al termine della I scansione, si ha un'isoterma di 4 minuti seguita da un quenching (con velocità di raffreddamento di 100 °C/min) fino alla temperatura di -65 °C; i campioni vengono poi sottoposti a un secondo riscaldamento, da -65°C a $T = T_m + 40$ °C, alla velocità di 20 °C/min.

Al fine di determinare i valori della temperatura e dell'entalpia legati al processo di cristallizzazione, nonché indirettamente la velocità di cristallizzazione in condizioni non isoterme, si è effettuato il seguente programma:

- III scansione: i campioni vengono sottoposti a un riscaldamento (a 20 °C/min) fino a una temperatura di 40°C superiore a T_m , mantenuti in temperatura per 4 minuti e raffreddati a una velocità di 5 °C/min fino ad una temperatura ben al di sotto della T_{cc} .

Nella prima scansione, le transizioni termiche subite dal campione sono determinate dalla storia termomeccanica pregressa mentre, nella seconda scansione, le transizioni dipendono esclusivamente dalla natura della sostanza e dalla storia termica relativa al raffreddamento tra le due scansioni. Ciò si verifica perché, al termine della prima scansione, il campione viene mantenuto per qualche minuto a una temperatura maggiore di T_m per cancellare la storia termica del polimero.

3.4.3 Termoanalisi dinamico-meccanica, DMTA

Questa tecnica consente di evidenziare le proprietà visco-elastiche dei materiali, dipendenti dalla temperatura, e di determinarne il modulo elastico e i valori di smorzamento, tramite l'applicazione di una sollecitazione meccanica dinamica, associata ad una scansione in temperatura. Questa analisi risulta molto utile in quanto permette anche di mettere in evidenza le transizioni a cui il materiale va incontro a ridotte temperature, informazione difficile da ricavare con altri metodi di caratterizzazione termica, nonché di stimare la temperatura di transizione vetrosa T_g .

È principalmente utilizzata per lo studio del comportamento visco-elastico dei polimeri. Infatti, questi materiali, le cui macromolecole sono costituite da catene di monomeri più o meno lunghe, mostrano proprietà visco-elastiche uniche, date dalla combinazione tra le caratteristiche dei solidi elastici e dei fluidi viscosi. Per analizzare il comportamento visco-elastico è pertanto utile tenere presenti entrambi gli aspetti: elasticità e viscosità; la teoria dell'elasticità descrive le proprietà meccaniche dei solidi in quell'intervallo in cui la tensione subita dal materiale risulta proporzionale alla deformazione, indipendentemente dalla velocità di deformazione; d'altra parte, le proprietà dei fluidi viscosi sono descritte dalla teoria dell'idrodinamica, relativamente alle situazioni in cui la risposta del materiale in termini di tensione è dipendente dalla velocità di deformazione. Il comportamento visco-elastico dei polimeri, a differenza del comportamento meccanico di ogni altra classe di materiali solidi, può quindi essere analizzato considerando che questo presenta contemporaneamente aspetti simili al comportamento elastico dei solidi e a quello viscoso dei liquidi.

L'analisi DMTA consiste nel sottoporre il campione all'azione di una forza sinusoidale (stress, σ) e nel misurarne le corrispondenti deformazioni (strain, ϵ). Per un solido perfettamente elastico i risultanti valori di stress e strain sarebbero esattamente in fase, mentre per un fluido puramente viscoso il segnale di deformazione avrebbe un ritardo di fase di 90° rispetto a quello di tensione. Come detto, i polimeri visco-elastici presentano delle proprietà intermedie a questi due comportamenti meccanici e sono, infatti, caratterizzati da uno sfasamento δ tra deformazione e tensione, tale che $0^\circ < \delta < 90^\circ$:

$$\begin{aligned}\sigma &= \sigma_0 \sin(t\omega + \delta) \\ \epsilon &= \epsilon_0 \sin(t\omega)\end{aligned}$$

Con l'analisi DMTA è quindi possibile mettere in evidenza il comportamento visco-elastico dei solidi polimerici; il risultato di tale indagine è, infatti, un grafico avente in ascissa la temperatura e in ordinata il valore del modulo elastico, sul quale sono riportati tre segnali:

- il modulo elastico di perdita; quantifica l'energia dissipata sotto forma di calore durante la deformazione, a causa dei microscorrimenti irreversibili delle macromolecole, e rappresenta la risposta della componente viscosa alla sollecitazione;

$$E_{loss} = \frac{\sigma_0}{\epsilon_0} \sin \delta$$

- modulo elastico di accumulo; rappresenta l'energia immagazzinata dal materiale durante la deformazione e tiene conto della componente elastica del comportamento meccanico del materiale;

$$E_{storage} = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos \delta$$

- tangente di δ , ossia il segnale dato dal rapporto tra il modulo elastico di perdita e quello di accumulo.

Una delle principali applicazioni dell'analisi DMTA consiste nella determinazione della temperatura di transizione vetrosa (T_g) dei materiali polimerici, in corrispondenza della quale si assiste ad un notevole decremento della rigidità del polimero, il quale assume, per temperature superiori, una consistenza gommosa e molto più viscosa. La T_g può essere individuata sulla curva DMTA come la temperatura alla quale il modulo elastico di accumulo presenta la massima velocità di decrescita e, in corrispondenza, il modulo elastico di perdita raggiunge un picco massimo, come mostrato in figura 3.10.

La strumentazione impiegata per tale analisi si compone di un sensore di spostamento, che misura la deformazione indotta sul provino in seguito all'applicazione della sollecitazione oscillante, un sistema di controllo della temperatura, un motore che sviluppa il carico corrispondente alla forza che si intende applicare, un albero motore che funge da guida per la trasmissione dello sforzo dal motore al campione e dei morsetti tali da afferrare e mantenere in posizione il campione in prova. L'analisi DMTA può essere effettuata secondo due modalità: eseguendo una scansione in temperatura, durante la quale viene applicata la medesima forza oscillante, oppure variando la frequenza di quest'ultima, mentre viene mantenuta costante la temperatura.

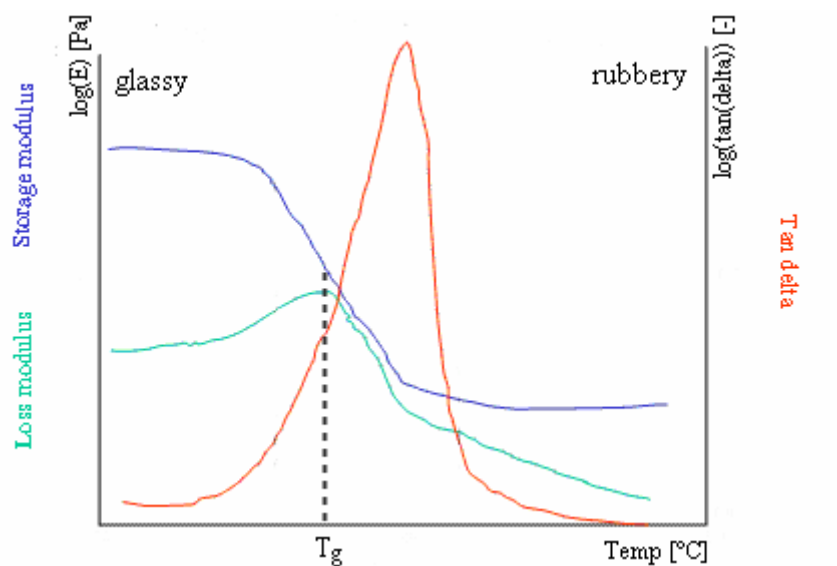


Fig. 3.10 Tracciato DMTA e determinazione della temperatura di transizione vetrosa.

Nel caso specifico, le prove dinamico-meccaniche sono state effettuate in flessione (bending), utilizzando uno strumento DMTA IV (Rheometric Scientific, Germania) in modalità *dual cantilever*, secondo la prima modalità di scansione. Per questo tipo di analisi, il provino si presenta come una barretta di dimensioni 30 x 8 x 1,6 mm, ricavabile mediante un processo di stampaggio a iniezione. Il polimero, precedentemente macinato, viene inserito all'interno di una camera riscaldata (con temperatura di 40 °C superiore a T_m) e sottoposto a movimenti rotatori, per garantire la perfetta omogeneizzazione del materiale. Una volta ottenuta la completa fusione del polimero, questo viene iniettato in uno stampo dalle apposite dimensioni e lasciato raffreddare fino a temperatura ambiente.

Il provino viene posto nella cella di misura e fissato con l'ausilio di tre morsetti (*clamp*) in titanio; il *clamp* centrale impone al materiale una sollecitazione periodica, mentre i due laterali rimangono fissi per tutta la durata della prova. La misura viene effettuata in scansione di temperatura, mantenendo cioè fisse la frequenza e l'ampiezza della sollecitazione e registrando le variazioni di modulo (E) e $\tan\delta$, in funzione della temperatura. Quest'analisi permette dunque di identificare i valori di temperatura corrispondenti sia alla transizione vetrosa della fase amorfa sia a eventuali transizioni secondarie nello stato vetroso, relative a moti locali di piccola entità.

Le misure sono state condotte in aria, facendo variare la temperatura ad una velocità di 3 °C/min da -150 °C a un valore, stimato per ciascun campione in base ai risultati ottenuti dalla caratterizzazione termica, corrispondente alla temperatura alla quale, sul tracciato DSC, ha inizio il picco endotermico relativo alla fusione. Ad esempio, per il campione caratterizzato da una lunghezza dei blocchi pari a 7, che presenta una temperatura di fusione di 140 °C, come temperatura massima del range di scansione è stato impostato il valore di 70 °C. In tal modo ci si assicura di evitare che il materiale inizi a rammollire durante l'analisi.

Per la forza oscillante è stata impostata una frequenza pari a 3 Hz e un'ampiezza di 0,1 MPa. La forza con cui si sollecita il provino durante l'analisi viene impostata in modo tale da rimanere nel campo elastico del materiale, nel quale si manifesta, unitamente a quella viscosa, la risposta elastica alla sollecitazione. Per garantire questa condizione ci si basa sulla curva stress-strain di ciascun campione, ricavata dalle prove meccaniche a trazione, sulla quale si individua il valore massimo di tensione al di sotto del quale tensione e deformazione risultano direttamente proporzionali (vedi paragrafo 3.6).

3.5 Caratterizzazione strutturale

3.5.1 Diffrazione a raggi X, XRD

La diffrazione a raggi X è una tecnica spettroscopica che consente di compiere un'analisi strutturale e massiva delle sostanze cristalline organiche ed inorganiche tramite la determinazione delle distanze

interplanari, del grado di cristallinità, dei parametri della cella elementare e di eventuali forme di polimorfismo o isomorfismo; infatti, nel caso dei polimeri, viene principalmente sfruttata per stabilire il grado di cristallinità del materiale.

Questa tecnica si basa sul fenomeno della diffrazione, ossia sull'interazione costruttiva della radiazione uscente dal solido cristallino investito dai raggi X, grazie al rilevamento della quale è possibile stimare la distanza interplanare, o distanza di legame, cioè la distanza tra i piani reticolari della fase cristallina. Tale distanza funge da parametro diagnostico in quanto ogni sostanza cristallina è caratterizzata da una specifica famiglia di distanze interplanari che dunque la discriminano dalle altre, anche a parità di geometria del reticolo cristallino. Quando un fascio di raggi X colpisce un reticolo cristallino ne mette in vibrazione gli elettroni con una frequenza pari a quella della radiazione incidente. Gli elettroni si pongono in vibrazione a causa del fatto che assorbono parte dell'energia della radiazione incidente, mentre ne riflettono la restante. Per alcune direzioni specifiche del fascio incidente, le radiazioni riflesse interferiscono reciprocamente in maniera costruttiva, producendo il cosiddetto effetto di diffrazione. Ogni atomo del reticolo può, dunque, essere considerato come un centro di emissione, dato che i suoi elettroni riflettono parte della radiazione che li ha investiti: si instaura un'interferenza costruttiva quando i fronti d'onda riflessi dal materiale sono in fase; in tal caso, il fenomeno della diffrazione può essere rilevato. Il principio di funzionamento di questa tecnica di analisi, che si basa appunto sul fenomeno della diffrazione, è regolato dalla Legge di Bragg. Egli scoprì, infatti, che la diffrazione può essere trattata come una riflessione selettiva basata su un meccanismo di interferenza costruttiva qualora si utilizzi una radiazione incidente monocromatica. Dato che, come detto, il fenomeno della diffrazione è rilevabile quando si determina un'interferenza costruttiva, è necessario che le onde riflesse dal materiale, che saranno rilevate dal detector, siano parallele e in fase. Garantite queste condizioni, si applica la Legge di Bragg, grazie alla quale, misurando l'angolo di incidenza θ , è possibile determinare il valore della distanza di legame d :

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

dove λ indica la lunghezza d'onda della radiazione incidente. Il parametro d rappresenta ciò che si intende stimare con tale tecnica, in quanto, come detto, la conoscenza del suo valore porta alla risoluzione della cristallografia del materiale analizzato.

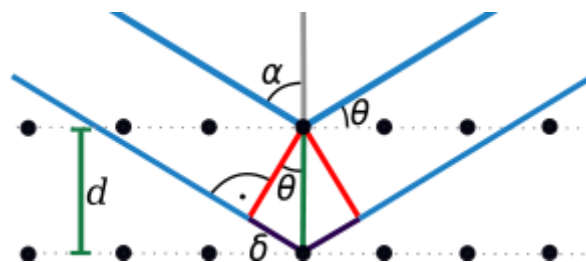


Fig. 3.11 Schematizzazione dei piani reticolari e dei parametri coinvolti nella Legge di Bragg.

I pattern di diffrazione a raggi X dei film polimerici sono stati ricavati utilizzando un diffrattometro PANalytical X'PertPro, equipaggiato con una sorgente di raggi X con anodo di rame ($\lambda = 0.15418$ nm) e un detettore allo stato solido X'Celerator. I dati sono stati acquisiti nell'intervallo di 2θ che va da $2,97^\circ$ a 70° , con passo $0,10^\circ$ e acquisendo per 100 s/step. Gli indici di cristallinità, X_C , sono stati calcolati, in base ai profili XRD, dal rapporto tra l'area di diffrazione cristallina (A_C) e l'area totale del profilo di diffrazione (A_T):

$$X_C = \frac{A_C}{A_T}$$

L'area di diffrazione cristallina è stata ottenuta sottraendo all'area totale del pattern di diffrazione il profilo relativo alla fase amorfa, modellato come picco a campana sulla linea di base. In tutte le analisi, lo scattering non coerente è stato tenuto in considerazione.

3.5.2 Misura dell'angolo di contatto, WCA

Le misure dell'angolo di contatto vengono generalmente effettuate per determinare la bagnabilità di una superficie. L'angolo di contatto è una grandezza termodinamica definita come l'angolo formato dall'incontro di un solido con la tangente al profilo della goccia del liquido nel punto di contatto tra il profilo della goccia e la superficie del solido su cui questa poggia.

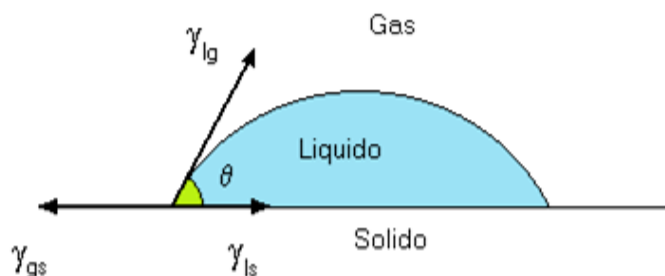


Fig. 3.12 Definizione dell'angolo di contatto, θ .

Tenendo conto di questa definizione, l'angolo di contatto che si determina tra una certa superficie solida e il profilo della goccia di liquido corrisponde alla configurazione che minimizza l'energia libera superficiale del sistema, ed è, infatti, fisicamente descritto dalla legge di Young, la quale corrisponde al bilancio delle forze orizzontali agenti su una goccia di volume trascurabile deposta su una superficie ideale (Gene Whyman *et al*, 2008):

$$\gamma_{SG} - \gamma_{SL} - \gamma_{LG} \cos \theta = 0$$

Per convenzione si definiscono idrofobiche le superfici aventi un angolo di contatto con l'acqua maggiore di 90° , idrofiliche quelle caratterizzate da angoli di contatto minori di 90° .

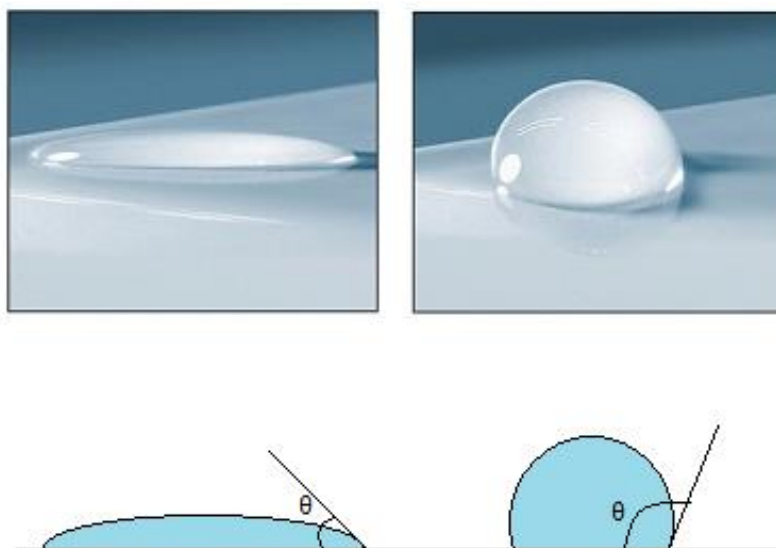


Fig. 3.13 Correlazione bagnabilità superficiale-angolo di contatto: elevata bagnabilità per $\theta < 90^\circ$, ridotta bagnabilità per $\theta > 90^\circ$.

Le misure dell'angolo di contatto sono state effettuate mediante lo strumento CAM101 (KSV), formato da un banco ottico costituito da una sorgente di luce ad intensità regolabile, una telecamera digitale dotata di zoom ottico con funzione di rivelatore (in quanto riprende la caduta e la deposizione della goccia sul campione) e da un piatto portacampione mobile interposto tra le due; sopra al portacampione è installato un sistema dosatore del liquido ad elevata precisione, comandato elettronicamente. La telecamera è interfacciata con un software in grado di acquisire ed analizzare l'immagine. Il software gestisce algoritmi con cui, tramite un calcolo ad approssimazioni successive, è possibile ottenere il profilo della goccia che meglio si adatta al contorno reale ottenuto dall'immagine. In base a tale profilo, sfruttando gli strumenti forniti dal software, si procede alla stima dell'angolo di contatto tracciando la retta tangente al profilo della goccia nel suo punto di contatto con il solido.

I campioni da analizzare sono stati precedentemente sottoposti a una serie di lavaggi consecutivi con una soluzione al 70% v/v EtOH/H₂O e con acqua distillata, per rimuovere eventuali residui grassi dalla superficie, ed essiccati sotto vuoto, a temperatura ambiente, per mezzo di P₂O₅. Per ogni campione sono state depositate 5 gocce di acqua deionizzata da 4 μ L ciascuna, ad una velocità di 100 μ L/min, in punti del provino sempre diversi, al fine di evitare il contatto con superfici già bagnate. Le prove sono state condotte a temperatura ambiente. I dati di angolo di contatto per ogni provino sono espressi come valori medi ricavati dalle 5 misure \pm deviazione standard.

3.6 Caratterizzazione meccanica

Le misure di resistenza meccanica vengono utilizzate per studiare il comportamento dei materiali polimerici in presenza di sollecitazioni di diverso tipo. Esse rivestono notevole importanza nella progettazione di un manufatto, in quanto permettono di prevederne il comportamento meccanico nelle condizioni d'uso.

Nelle prove tensili, ossia quelle in cui il provino è sottoposto a trazione, lo sforzo σ (*stress*) viene definito dal rapporto tra il carico applicato N e l'area A della sezione resistente del provino prima del test:

$$\sigma = \frac{N}{A}$$

e la deformazione ε (*strain*) corrisponde all'allungamento (Δl) relativo alla lunghezza iniziale (l) del provino:

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l}$$

Durante la prova si misura il valore del carico al variare della lunghezza del provino e in tal modo si ottiene la curva sforzo-deformazione caratteristica del materiale. La figura 3.14 mostra l'andamento tipico di tale curva per i materiali polimerici.

La prima parte di questa curva presenta sempre, per un tratto più o meno esteso, un andamento lineare, nel quale, infatti, la risposta del materiale alla trazione segue la Legge di Hooke:

$$\sigma = E \cdot \varepsilon$$

dove la costante di proporzionalità E è il modulo elastico di Young, il quale, per definizione, indica la pendenza del tratto iniziale rettilineo della curva sforzo-deformazione. Tale tratto è detto campo elastico del materiale, in quanto, per carichi in esso compresi, il materiale si allunga elasticamente, ovvero può riprendere la lunghezza originaria quando il carico ritorna a zero. All'aumentare della deformazione, si arriva ad un punto detto di snervamento (o *yield point*), in corrispondenza del quale si passa dal campo elastico a quello plastico: superato lo snervamento, si ha infatti che parte della deformazione indotta permane nel provino anche qualora il carico venisse rimosso; si determina, cioè, una deformazione residua, da attribuirsi ad uno scorrimento irreversibile dei piani reticolari causato dal carico subito. Il campo plastico del materiale si conclude nel punto di frattura, la quale si verifica in corrispondenza del carico di rottura. L'area sottesa dal tratto plastico della curva σ - ε fornisce una misura della tenacità del materiale, grandezza che quantifica l'energia necessaria per portare il materiale a completa rottura. Inoltre, la lunghezza del tratto plastico è proporzionale alla duttilità del campione analizzato, proprietà che indica la capacità di un materiale di deformarsi plasticamente sotto carico prima di giungere a rottura, cioè la capacità di sopportare deformazioni plastiche: un corpo è tanto più duttile quanto maggiore è la deformazione raggiunta prima della rottura.

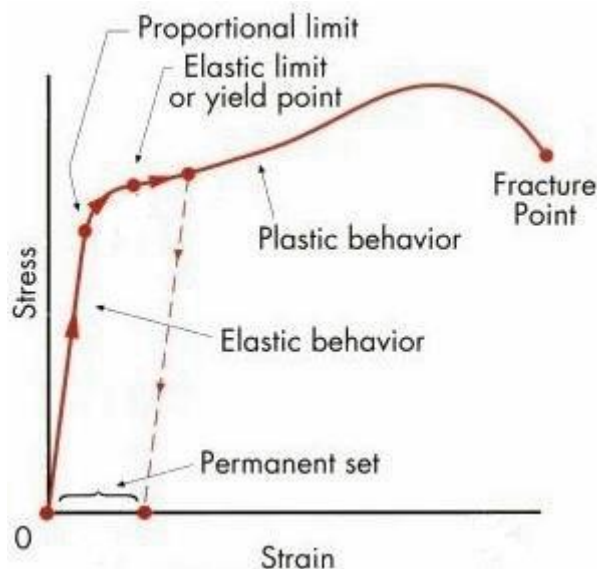


Fig. 3.14 Esempio di curva σ - ϵ .

Le prove meccaniche sono state condotte utilizzando un dinamometro Instron 4465 con cella di carico da 100 N. Lo strumento è costituito da una struttura rigida di base e una traversa mobile posta nella parte superiore, tra le quali viene afferrato il provino, mediante appositi agganci. I campioni polimerici sono stati preparati sottoforma di striscioline dalle dimensioni di 5 x 40 mm e spessore pari a circa 0,2 mm. L'applicazione del carico viene effettuata mediante il movimento verso l'alto della traversa superiore; la forza impressa è misurata dalla cella di carico, alloggiata sulla traversa mobile, mentre l'allungamento viene determinato in base alla distanza percorsa dalla traversa mobile. Le prove sono state condotte a temperatura ambiente con velocità di trazione pari a 5 mm/min; per ogni campione sono state effettuate misure su 6 provini.

Il software, in base ai dati di carico e alle dimensioni del provino, permette di ottenere lo sforzo (forza per unità di superficie) corrispondente, convertendo le curve carico-spostamento in curve sforzo-deformazione; infatti, il calcolo della sezione resistente, sulla quale insiste il carico, viene effettuato automaticamente in seguito all'inserimento delle informazioni geometriche relative al provino, quali il suo spessore medio, misurato per ciascuno attraverso un micrometro. Per il calcolo della deformazione percentuale è inoltre necessario riportare nel software di elaborazione dati la lunghezza del tratto utile di ciascun provino all'inizio della relativa prova. Il modulo elastico, calcolato come pendenza del tratto iniziale della curva sforzo-deformazione ottenuta, è stato riportato come valore medio di tutte le prove, più deviazione standard.



Fig. 3.15 Macchinario utilizzato per le prove a trazione.

È necessario ricordare che i dati ottenuti tramite le prove meccaniche a trazione risentono delle condizioni ambientali, quali temperatura e umidità, e delle condizioni sperimentali, quali la velocità di trazione, la geometria e le dimensioni dei provini. È quindi opportuno operare in condizioni sperimentali strettamente controllate e ripetibili così da poter confrontare il comportamento meccanico dei diversi materiali e porlo in relazione con le caratteristiche strutturali. Inoltre, al fine di evitare alterazioni nelle misure, i campioni utilizzati devono risultare privi di imperfezioni o disomogeneità.

3.7 Studi di degradazione idrolitica

Le prove di degradazione idrolitica sono state effettuate al fine di delineare il profilo di degradazione dei campioni sintetizzati in condizioni che simulino l'ambiente biologico, e per stimarne, in particolare, la velocità di degradazione.

Gli esperimenti di degradazione idrolitica sono stati condotti in condizioni di temperatura e pH fisiologici, su film polimerici di dimensioni 5×40 mm e di spessore pari a circa 0,2 mm. I campioni sono stati inizialmente essiccati e pesati; successivamente sono stati puliti mediante risciacqui in una soluzione al 70% v/v EtOH/H₂O con acqua distillata e quindi inseriti in provette contenenti 8 mL di soluzione acquosa tamponata a pH 7,4 con tampone fosfato. Sono stati così mantenuti ad una temperatura costante di 37 °C per periodi di tempo variabili, all'interno di un bagno termostatico (Julabo SW22) con scuotitore, in azione alla frequenza di 50 giri/min. La soluzione tampone, cambiata periodicamente (ogni 3 settimane) per

mantenere costante il pH, è stata preparata seguendo la seguente procedura: in 800 mL di acqua distillata, vengono disciolti 8 g di NaCl, 0,2 g di KCl, 1,44 g di Na₂HPO₄ e 0,24 g di KH₂PO₄; il pH della soluzione è aggiustato al valore di 7,4 per aggiunta di HCl e il volume finale portato ad 1 L. Da ultimo la soluzione viene sterilizzata in autoclave (a 121 °C per 20 minuti) al fine di evitare la crescita di microrganismi al suo interno.

Nello specifico, sono state preparate e mantenute in incubazione, per diversi periodi di tempo, 20 provette per ciascuno dei cinque campioni di P(BCE_xDGCE_x) e 10 provette per l'omopolimero PBCE.

Per monitorare, al trascorrere del tempo, gli effetti del processo di degradazione sui campioni si è stabilito un calendario dei prelievi; quindi, periodicamente, i campioni sono stati rimossi in duplicato dall'incubatore, lavati con acqua distillata, asciugati accuratamente e posti, infine, in essiccatore sotto vuoto in presenza di P₂O₅ a temperatura ambiente, così da eliminare anche l'acqua residua.

I campioni parzialmente degradati, prelevati a diversi tempi di degradazione, sono stati quindi pesati e, per confronto con il peso misurato prima dell'incubazione, è stata quantificata la perdita di peso di ciascuno, principale parametro attraverso cui mettere in evidenza gli effetti della degradazione idrolitica.

Analisi mediante cromatografia a permeazione su gel (GPC) sono state condotte su tutti i campioni parzialmente degradati, al fine di stimare anche le variazioni di peso molecolare dovute al processo di degradazione.

3.8 Test di biocompatibilità

3.8.1 Sterilizzazione dei polimeri

La semina di cellule sui film è stata preceduta dalla sterilizzazione del materiale polimerico mediante il seguente protocollo:

- lavaggio di 15 minuti in etanolo 70%;
- ripetuti lavaggi (3-4) in tampone fosfato salino (PBS) addizionato di antibiotici streptomicina/penicillina 2% e amfotericina B 0,2%;
- immersione in tale soluzione per una notte sotto l'azione di raggi ultravioletti di tipo C (UVC);
- ripetuti lavaggi in PBS standard, sostituito in seguito con 1 mL di terreno di coltura per tamburello;

3.8.2 Cardiomioblasti ventricolari di embrione di ratto: cellule H9c2

Nella caratterizzazione della metodica di semina dei vari film sono stati impiegati cardiomioblasti ventricolari di embrione di *Rattus Norvegicus* (linea H9c2). Questa linea cellulare immortalizzata ottenuta dalla European Collection of Cells Cultures, già parzialmente differenziata in senso cardiaco, presenta

caratteristiche confrontabili con quelle espresse da cardiomioblasti embrionali, come assenza di gap junctions, caveole, tubuli T, miofibrille con sarcomeri organizzati, presenza di reticolo endoplasmatico rugoso ben organizzato, superficie cellulare ricca di microvilli, correnti del Ca^{2+} di tipo L. La coltura è mantenuta in terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) completo di penicillina/streptomicina 100 U/mL, L-glutamina 0,1 µg/mL, siero bovino fetale (FBS) al 10%, posta in incubatore a 37 °C in atmosfera di CO_2 al 5%. Il terreno viene generalmente sostituito ogni 2/3 giorni per evitare l'abbassamento del pH – da 7,4 a valori acidi – dovuta alla liberazioni di metaboliti di scarto da parte delle cellule nel terreno stesso.



Fig. 3.16 Cellule H9c2.

3.8.3 Tripsinizzazione

Quando nelle piastre di coltura la superficie di crescita non risulta più sufficiente alla sistemazione di nuove cellule figlie la coltura si definisce confluenta. A causa dell'inibizione da contatto, in una coltura confluenta, le moltiplicazioni cessano e si ha quindi un rallentamento del metabolismo, con conseguente accumulo di prodotti tossici. Per permettere alle cellule di continuare a crescere è, quindi, necessario procedere a periodici 'trapianti' in terreni freschi. A tale scopo si utilizza un procedimento indicato come tripsinizzazione, che consente di staccare le cellule dal substrato al quale sono adese, risospenderle in soluzione e, quindi, 'trapiantarle' in mezzo fresco, ricco di tutti quei componenti necessari alle cellule per le loro attività metaboliche (vitamine, sali inorganici, proteine e costituenti sierici). Il distacco delle cellule dal substrato d'adesione è reso possibile dall'impiego di un particolare enzima proteolitico, la Tripsina-EDTA, che digerisce il materiale glicoproteico presente sulla membrana cellulare, responsabile dell'adesione, senza distruggere o uccidere le cellule; l'EDTA (acido etilendiamminotetracetico) è un chelante in grado di chelare ioni Mg^{2+} e Ca^{2+} indispensabili alle cellule nel processo di adesione. Nello specifico, la tripsina è un enzima, appartenente alla classe delle idrolasi (enzimi che catalizzano l'idrolisi), che catalizza il taglio

proteolitico con specificità per l'arginina e la lisina. La tripsina è quindi in grado di scindere le proteine in polipeptidi più piccoli rendendo possibile il taglio dei ponti proteici che mantengono le cellule adese fra di loro e alle pareti dei contenitori (capsule di Petri).

Protocollo di tripsinizzazione:

- aspirazione del terreno di coltura e lavaggio con PBS per eliminare i costituenti di FBS, aggiunto nel terreno di coltura, in grado di inibire l'azione della tripsina;
- aggiunta di 2 mL (per petri da 10 cm di diametro) di Tripsina (170.000 U/L) EDTA (200 mg/L);
- si posiziona, quindi, la petri in incubatore a 37 °C per 3-5 min così da attivare l'enzima;
- si preleva e poi si pone la sospensione Tripsina EDTA/cellule in un tubo con 5 mL circa di terreno fresco completo di FBS in grado di inibire la tripsina;
- si centrifuga a 1100 rpm per 5 min a 4 °C per bloccare l'attività enzimatica;
- si aspira il surnatante;
- si risospende, infine, il pellet cellulare ottenuto nella quantità di terreno desiderata.

3.8.4 Conta cellulare mediante camera di Burker

La camera di Burker consta di una robusta lastra di vetro rettangolare, che presenta al centro un rilievo, delimitato da ambo i lati da due scanalature parallele, ed un corto solco trasversale che divide questo rilievo centrale in due metà, ciascuna delle quali porta inciso un reticolo di conta. I due reticoli vengono coperti da un unico vetrino coprioggetto tenuto aderente da due morsetti laterali metallici o semplicemente da un sottile film di acqua. Questa adesione dà la giusta altezza, tra la camera ed il coprioggetto, di 1/10 mm.

Ciascuna rete di conteggio è suddivisa in 9 quadrati grandi delimitati da tre righe parallele per ciascun lato. Ogni quadrato grande ha un'area di 1 mm² ed un volume corrispondente a 0,1 mm³, quindi 0,1 µL, ed è suddiviso in 16 quadrati separati tra loro da una doppia linea. Si contano le cellule presenti in 4/5 quadrati grandi (generalmente quello centrale ed i 4 ai vertici): la media aritmetica viene moltiplicata per il fattore di diluizione (ovvero per 10⁴ se le cellule sono state risospese in 1 mL). Per conoscere quanti mL di sospensione cellulare si devono seminare (X) è necessario effettuare la seguente proporzione:

$$\text{n° di cellule contate} : \text{mL di terreno usato} = \text{n° di cellule da seminare} : X$$

Per quanto concerne la metodica, durante la fase di tripsinizzazione, dopo aver ottenuto il pellet ed aggiunto il terreno di coltura, è stata trasferita una piccola quantità di sospensione cellulare (10 µL) in una o entrambe le camere del vetrino (con il coprioggetto montato): il riempimento della/e camera/e avviene per capillarità attraverso i solchi.

3.8.5 Test di vitalità e crescita cellulare: the PrestoBlue[®] assay

Prove di vitalità e crescita cellulare sono state eseguite utilizzando PrestoBlue® (Invitrogen), un colorante vitale non tossico a base di Resazurina che permette di analizzare ripetutamente una stessa popolazione cellulare proliferante.

Il metodo si basa sulla valutazione del rapporto tra NADPH/NADP, FADH/FAD, FMNH/FMN e NADH/NAD, che aumenta durante la proliferazione cellulare. PrestoBlue® viene ridotto da questi intermedi del metabolismo e a questo processo si accompagna una variazione della fluorescenza emessa (Ex/Em = 540/590 nm) che può essere quantificata al fluorimetro, oltre ad una variazione colorimetrica, passando dal blu (forma ossidata) al rosa (forma ridotta).

Per quanto concerne la metodica: PrestoBlue® è stato utilizzato alla concentrazione del 10% in apposito terreno di coltura e lasciato a contatto con le cellule per 30 minuti in incubatore a 37 °C; al termine di questo periodo d'incubazione il medium contenente il colorante è stato trasferito in apposito fluorimetro mentre alla coltura cellulare, dopo un lavaggio con tampone fosfato PBS, è stato aggiunto terreno fresco.

Il test è stato eseguito 24 ore dopo la semina e ripetuto il settimo e quattordicesimo giorno.

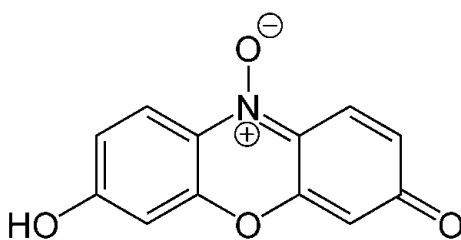


Fig. 3.17 Struttura della Resazurina.

3.8.6 Prove di citotossicità indiretta

Una prima problematica da affrontare è stata la verifica dell'eventuale liberazione nel medium di coltura, da parte dei supporti polimerici testati, di prodotti di degradazione in grado di provocare effetti di citotossicità e/o citostasi indotti (test di citotossicità indiretta).

Seguendo il protocollo ISO10993-5 (standard internazionale per la valutazione biologica di dispositivi biomedicali) un campione di ogni polimero, dopo opportuna procedura di sterilizzazione (paragrafo 3.8.1), è stato posto a contatto con terreno di coltura completo DMEM (5 mg di polimero/mL di terreno) in incubatore per 24 ore; successivamente il terreno è stato filtrato e sostituito al medium di coltura di cellule H9c2 seminate 48 ore prima. Dopo un'incubazione di 24 ore la vitalità cellulare è stata valutata utilizzando il test di vitalità con PrestoBlue®. Sono stati eseguiti tre esperimenti separati, ognuno caratterizzato da 2 replicati, utilizzando come controllo negativo di citotossicità terreno di coltura che non era stato precedentemente incubato con i polimeri da testare.

3.8.7 Prove di citotossicità diretta

Le prove di citotossicità diretta, dette anche di citocompatibilità, consistono in test di adesione e proliferazione cellulare, implicanti il contatto diretto delle cellule col materiale da testare. Esse consentono di verificare l'evoluzione, in termini di vitalità, proliferazione e crescita, di una popolazione cellulare seminata a bordo.

Questa metodica verrà descritta in maniera dettagliata nel paragrafo 4. 6.

QUARTO CAPITOLO. RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo capitolo verranno presentati e discussi i risultati delle prove di caratterizzazione effettuate sugli omopolimeri PBCE, PDGCE e sui copolimeri a blocchi $P(\text{BCE}_x\text{DGCE}_y)$, le cui strutture chimiche e le relative strategie di sintesi sono state descritte al paragrafo 3.1.

4.1 Caratterizzazione molecolare

A temperatura ambiente, tutti i campioni sintetizzati si presentano come solidi semicristallini e opachi, di colore giallo chiaro, ad eccezione del PDGCE, la cui natura amorfa gli conferisce un aspetto gommoso e trasparente. Inoltre, la presenza di eteroatomi di O nella struttura polimerica impartisce ai campioni una maggiore elasticità e un colore più scuro rispetto al PBCE.

I dati riguardanti la caratterizzazione molecolare dei copolimeri e dei rispettivi omopolimeri sono riportati in tabella 4.1. I pedici rappresentano, per ciascun copolimero, la lunghezza media dei blocchi delle relative unità comonomeriche.

Tabella 4.1 Dati di caratterizzazione molecolare, $P(\text{BCE}_x\text{DGCE}_y)$.

Polimero	$M_n^{1)}$	$D^{2)}$	BCE (mol %) ³⁾	$L_{\text{BCE}}^{4)}$	$L_{\text{DGCE}}^{4)}$	$b^{5)}$
PBCE	48400	2.0	100	/	/	/
$P(\text{BCE}_{20}\text{DGCE}_{20})$	34900	2.3	50.4	20	20	0.1
$P(\text{BCE}_{11}\text{DGCE}_{11})$	34600	2.3	50.6	11	11	0.18
$P(\text{BCE}_7\text{DGCE}_7)$	38600	2.3	49.9	7	7	0.28
$P(\text{BCE}_4\text{DGCE}_4)$	42500	2.5	49.9	4	4	0.52
$P(\text{BCE}_2\text{DGCE}_2)$	49400	2.5	52.5	2	2	1.02
PDGCE	36000	2.2	0	/	/	/

¹⁾ peso molecolare medio numerico (GPC);

²⁾ indice di polidispersità (GPC);

³⁾ composizione effettiva (^1H -NMR);

⁴⁾ lunghezza dei blocchi delle unità comonomeriche (^{13}C -NMR);

⁵⁾ grado di statisticità (^{13}C -NMR).

Mediante analisi GPC è stato possibile dimostrare che copolimeri e omopolimeri risultano caratterizzati da pesi molecolari (M_n) elevati e confrontabili, indice dell'assenza di processi di degradazione durante la sintesi e di un buon controllo della polimerizzazione. Per quanto riguarda i copolimeri, si osserva un lieve aumento del peso molecolare all'aumentare del tempo di reazione, imputabile al prevalere delle reazioni di transesterificazione. Infatti, mentre per tempi brevi sono favorite le reazioni di scissione del legame estereo, all'aumentare del tempo di reazione si assiste alla formazione di blocchi di lunghezza sempre minore e al conseguente moltiplicarsi dei terminali reattivi che comportano un progressivo aumento delle reazioni di policondensazione e quindi del peso molecolare. Inoltre, il processo di polimerizzazione non ha alterato significativamente la distribuzione dei pesi molecolari, come indicato dai valori circa costanti degli indici di polidispersità.

Al fine di verificare la struttura chimica dei polimeri sintetizzati, i campioni sono stati sottoposti a spettroscopia $^1\text{H-NMR}$; in tutti i casi, gli spettri ottenuti sono risultati coerenti con la struttura prevista, permettendo di escludere la presenza di reazioni secondarie durante la polimerizzazione. A titolo di esempio, nelle figure 4.1 e 4.2 sono riportati gli spettri dei due omopolimeri, con la relativa assegnazione dei segnali.

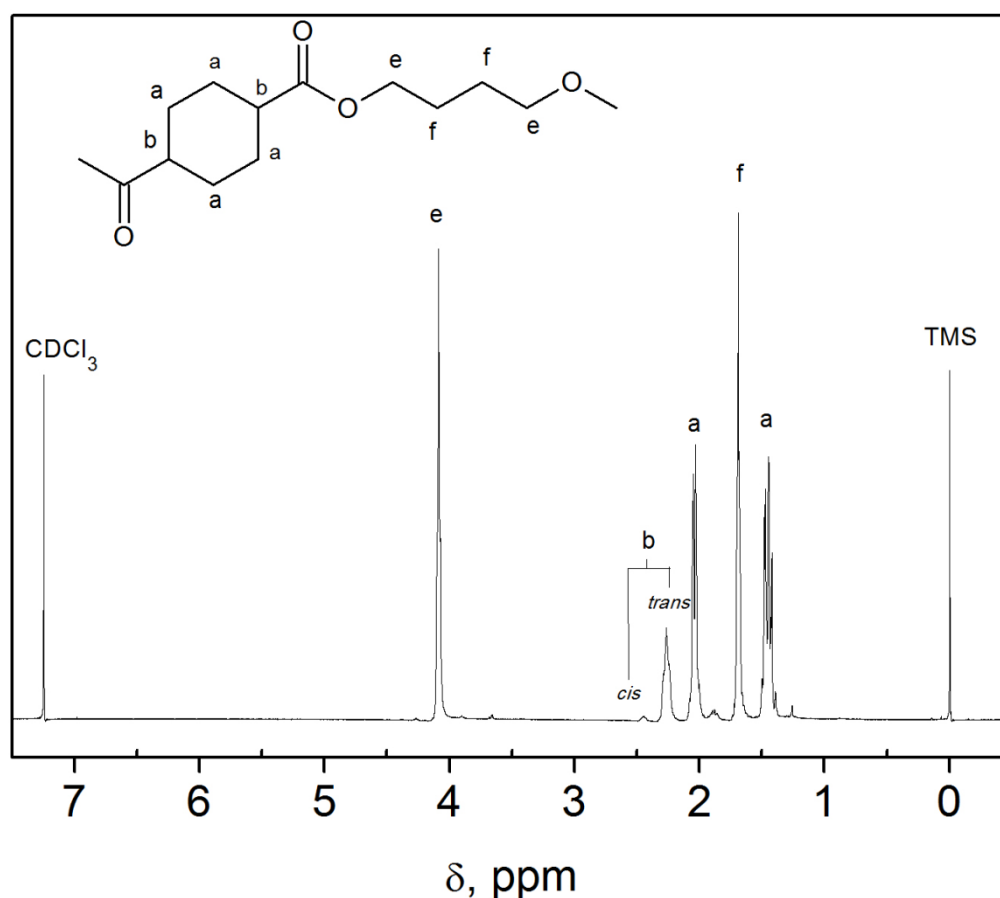


Fig. 4.1 Spettro $^1\text{H-NMR}$, PBCE.

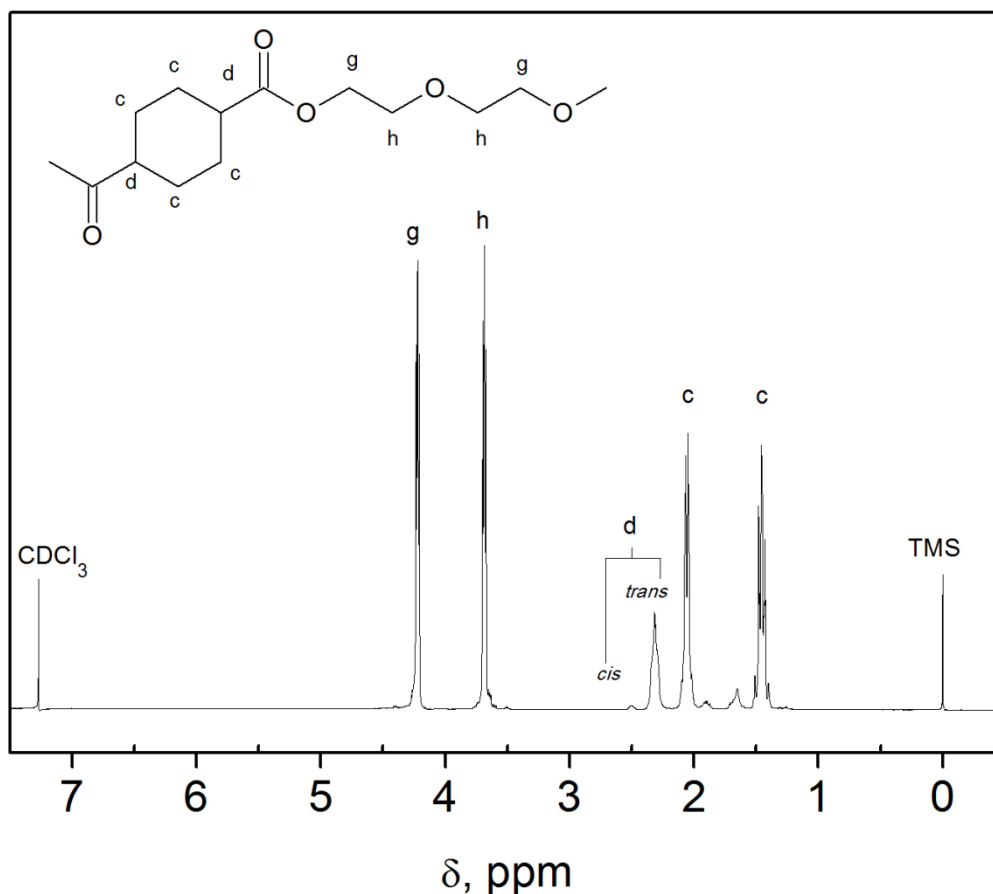


Fig. 4.2 Spettro ^1H -NMR, PDGCE.

Per quanto riguarda i copolimeri, la loro composizione effettiva è stata valutata mediante analisi ^1H -NMR, tenendo conto delle aree dei protoni presenti nelle subunità tipiche di ciascuno dei due omopolimeri. Il calcolo della composizione è stato effettuato in base al rapporto tra le aree dei picchi di risonanza dei protoni alifatici "e" (4.11 ppm intervallo 4.1-4.2) della subunità butandiolica e dei protoni "g" (4.25 ppm, intervallo 4.2-4.3) dei gruppi metilenici della subunità dietilenglicole. A titolo di esempio in figura 4.3 è stato riportato lo spettro del $\text{P}(\text{BCE}_7\text{DGCE}_7)$, con la relativa assegnazione dei picchi.

Dai dati riportati in tabella 4.1, è possibile notare come la composizione effettiva sia risultata, in tutti i casi, molto vicina a quella di alimentazione, cioè pressoché equimolare.

L'analisi di spettri NMR può essere, inoltre, utilizzata per studiare i cambiamenti strutturali indotti nei copolimeri dalle reazioni di transesterificazione e per monitorare il procedere di queste reazioni al variare del tempo di mescolamento. Dal momento che i picchi di interesse per seguire le reazioni di transesterificazione non apparivano sufficientemente risolti nello spettro ^1H -NMR, si è scelto di effettuare un'analisi spettroscopica ^{13}C -NMR, al fine di valutare le variazioni di lunghezza (L) e distribuzione delle unità comonomeriche lungo la catena polimerica (b), come descritto nel paragrafo 3.2.1. A titolo di esempio, in figura 4.4 è stato riportato lo spettro ^{13}C -NMR del $\text{P}(\text{BCE}_7\text{DGCE}_7)$, con le relative assegnazioni dei picchi.

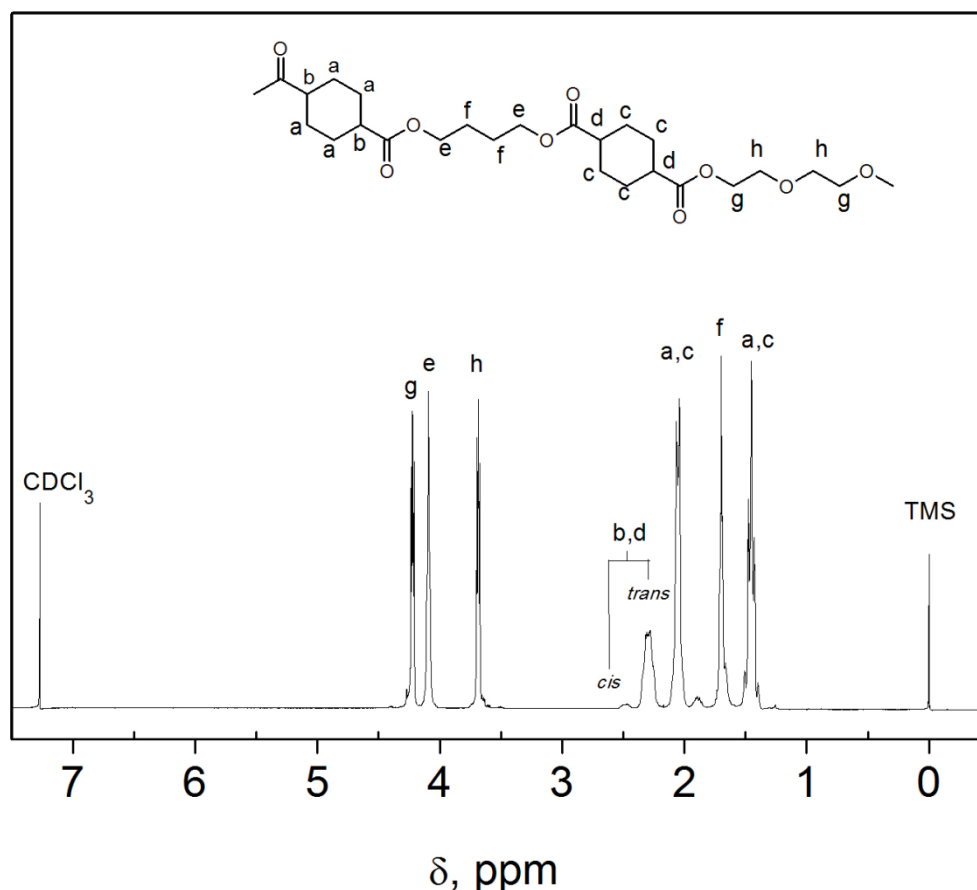


Fig. 4.3 Spettro ¹H-NMR, P(BCE₇DGCE₇).

Nella struttura di ciascun campione di copoliestere, è stato possibile individuare 3 subunità fondamentali: l'unità cicloesilendicarbossilato (CED), l'unità butandiolica (BD) e l'unità glicolica (dietilenglicole, DEG). Prendendo come subunità centrale l'unità CED, è possibile supporre la presenza di tre diverse sequenze: BD-CED-BD, tipica dell'omopolimero PBCE; DEG-CED-DEG, tipica dell'omopolimero PDGCE; e, infine, una sequenza mista BD-CED-DEG (o DEG-CED-BD) ottenuta in seguito alla reazione di transesterificazione tra i due omopolimeri. La disposizione delle subunità comonomeriche e, di conseguenza, l'avanzamento delle reazioni di transesterificazione possono essere monitorate osservando eventuali variazioni dei picchi relativi all'unità CED. A questo proposito, la regione compresa tra $\delta = 27.75$ e $\delta = 28.15$ ppm, dove sono collocati i segnali relativi ai carboni "2" e "7" del cicloesano, risulta di particolare interesse. L'espansione di tale regione, mostrata in figura 4.4, permette di notare la presenza di due intensi picchi riconducibili, in ordine di spostamento chimico crescente, alle sequenze caratteristiche di PBCE e PDGCE; accanto ai picchi relativi agli omopolimeri di partenza, si nota la presenza di un nuovo segnale (legato allo sviluppo di forme miste) la cui intensità aumenta all'aumentare del tempo di mescolamento. La comparsa di tale picco avviene, in presenza di reazioni di transesterificazione, a causa dell'istaurarsi di intorni chimici differenti, rispetto a quelli riscontrabili nei due omopolimeri. Poiché i picchi di risonanza relativi alla subunità in

oggetto risultavano parzialmente sovrapposti, lo spettro è stato elaborato mediante deconvoluzione, che ha portato a un'ottima separazione dei segnali.

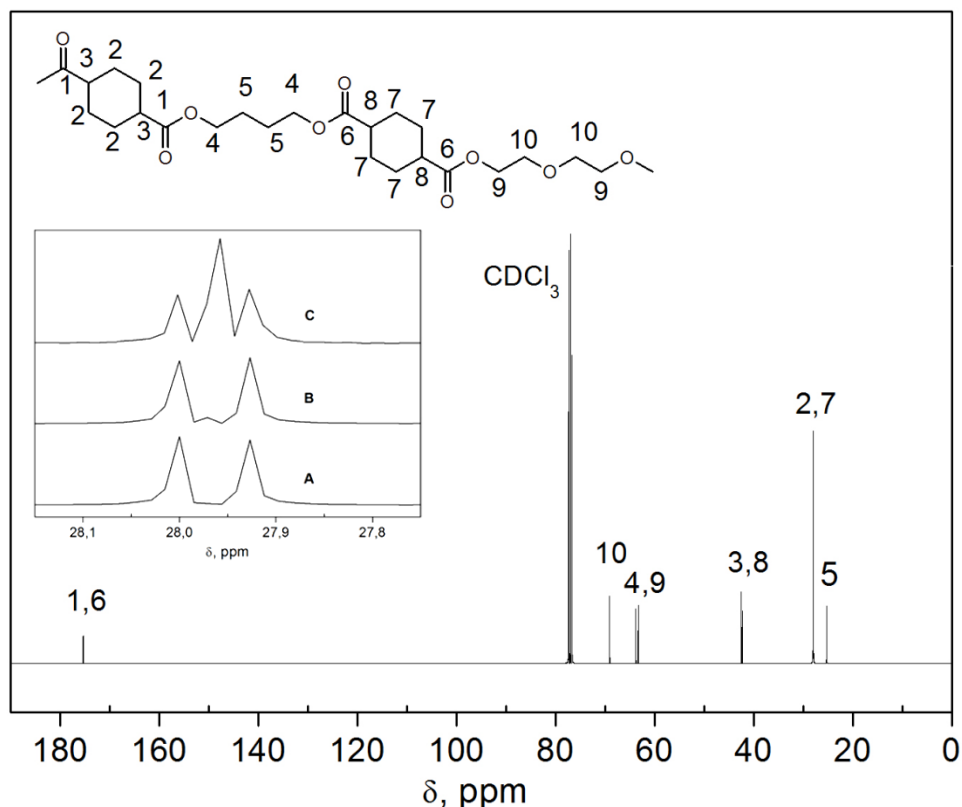


Fig. 4.4 Spettro ^{13}C -NMR, $\text{P}(\text{BCE}_7\text{DGCE}_7)$; in evidenza, l'espansione della regione compresa tra 27.75 e 28.15 per i copolimeri A) $\text{P}(\text{BCE}_{20}\text{DGCE}_{20})$ B) $\text{P}(\text{BCE}_7\text{DGCE}_7)$ C) $\text{P}(\text{BCE}_2\text{DGCE}_2)$.

La lunghezza media dei blocchi e il grado di statisticità (b), riportati in tabella 4.1, indicano che i copolimeri in oggetto sono caratterizzati da differenti architetture molecolari e mostrano un differente avanzamento delle reazioni di transesterificazione, al variare del tempo di mescolamento. I copolimeri ottenuti con minori tempi di reazione mostrano valori di b compresi tra 0.1 e 0.52, indice di una distribuzione a blocchi delle sequenze comonomeriche, mentre il campione $\text{P}(\text{BCE}_2\text{DGCE}_2)$, ottenuto con tempi di mescolamento maggiori, presenta b pari a 1.02 e, dunque, una distribuzione statistica delle sequenze. Per quanto concerne le sequenze di blocchi, è possibile notare che al prolungamento del tempo di mescolamento corrisponde una diminuzione della loro lunghezza; tale andamento risulta in accordo con quello evidenziato per il grado di statisticità ed è ascrivibile al procedere delle reazioni di scambio. È, dunque, possibile concludere che le condizioni sperimentali utilizzate permettono, mediante una semplice variazione del tempo di reazione, di ottenere sia svariati copolimeri a blocchi, la cui lunghezza diminuisce con l'aumento del tempo di mescolamento, che copolimeri statistici.

Nonostante la sintesi degli omopolimeri sia stata effettuata utilizzando un monomero (DMCED) con conformazione 100% *trans*, è risultata necessaria un'ulteriore analisi dei copolimeri, al fine di escludere la

presenza di reazioni di isomerizzazione durante il processo di miscelazione reattiva. Infatti, studi precedenti (Berti *et al.*, 2008; Colonna *et al.*, 2011) hanno riportato che, in seguito a trattamenti termici che prevedono temperature maggiori di 260 °C per più di un'ora, l'anello del gruppo 1,4-cicloesilene potrebbe subire isomerizzazione, tendendo al rapporto *cis/trans* termodinamicamente stabile di 34/66%. L'analisi $^1\text{H-NMR}$ è stata, dunque, utilizzata anche per calcolare la percentuale di *trans* nei polimeri sintetizzati, dal rapporto tra le aree dei segnali a 2.3 ppm (protoni dell'isomero *trans*) e a 2.5 ppm (isomero *cis*). Poiché in tutti i casi il contenuto della forma *cis* si è dimostrato inferiore al 3%, è possibile concludere che le reazioni di isomerizzazione sono state trascurabili.

4.2 Caratterizzazione termica e diffrattometrica

La caratterizzazione dei campioni sintetizzati è proseguita sottoponendoli alle seguenti analisi:

- termogravimetrica (TGA);
- calorimetria differenziale a scansione (DSC);
- diffrattometrica ai raggi X (WAXS).

I copolimeri sono stati, inoltre, sottoposti ad analisi dinamico meccanica (DMTA), al fine di confermare la miscibilità del sistema nello stato amorfo.

La tabella 4.2 riporta i dati riguardanti la caratterizzazione termica dei copolimeri $\text{P}(\text{BCE}_x\text{DGCE}_y)$ e dei relativi omopolimeri.

Tabella 4.2 Dati di caratterizzazione termica e diffrattometrica di PBCE, PDGCE e dei relativi copolimeri $\text{P}(\text{BCE}_x\text{DGCE}_y)$.

Polimero			1 st scan		2 nd scan							
	$T_{5\%}$ (°C)	T_{\max} (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_g (°C)	ΔC_p (J/°Cg)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_{cc} (°C)	X_c
PBCE	388	422	167	30	12	0.059	/	/	166	28	144	42 ± 3
$\text{P}(\text{BCE}_{20}\text{DGCE}_{20})$	389	431	158	18	-6	0.214	/	/	155	16	136	28 ± 3
$\text{P}(\text{BCE}_{11}\text{DGCE}_{11})$	385	434	150	17	-5	0.232	/	/	149	16	128	26 ± 3
$\text{P}(\text{BCE}_7\text{DGCE}_7)$	385	434	140	17	-5	0.237	/	/	140	16	117	25 ± 3
$\text{P}(\text{BCE}_4\text{DGCE}_4)$	389	433	120	15	-2	0.200	/	/	120	15	94	21 ± 3
$\text{P}(\text{BCE}_2\text{DGCE}_2)$	386	431	95	13	-3	0.301	50	14	95	12	59	n.d.
PDGCE	385	451	/	/	-7	0.370	/	/	/	/	/	/

Le prove termogravimetriche sono state condotte in atmosfera di azoto e hanno permesso di determinare, per ciascun polimero, i valori di temperatura corrispondenti a una perdita di peso del 5% ($T_{5\%loss}$) e alla massima velocità di perdita di peso (T_{max}). Come evidenziato dalle curve termogravimetriche, riportate in figura 4.5, la perdita di peso è in tutti i casi pari al 100% ed avviene praticamente in un unico stadio. Nonostante entrambi gli omopolimeri presentino un'elevata stabilità termica, da un confronto tra le rispettive curve termogravimetriche è possibile evidenziare la maggiore stabilità del PDGCE, dovuta alla presenza degli atomi di ossigeno nella catena polimerica. Questo andamento può essere, infatti, spiegato sulla base della maggiore energia del legame C-O rispetto al legame C-C.

Per quanto riguarda i copolimeri, essi presentano un comportamento intermedio rispetto ai due omopolimeri di riferimento e sono caratterizzati da valori di stabilità termica simili ed elevati (T_{max} compresa tra 431 °C e 434 °C).

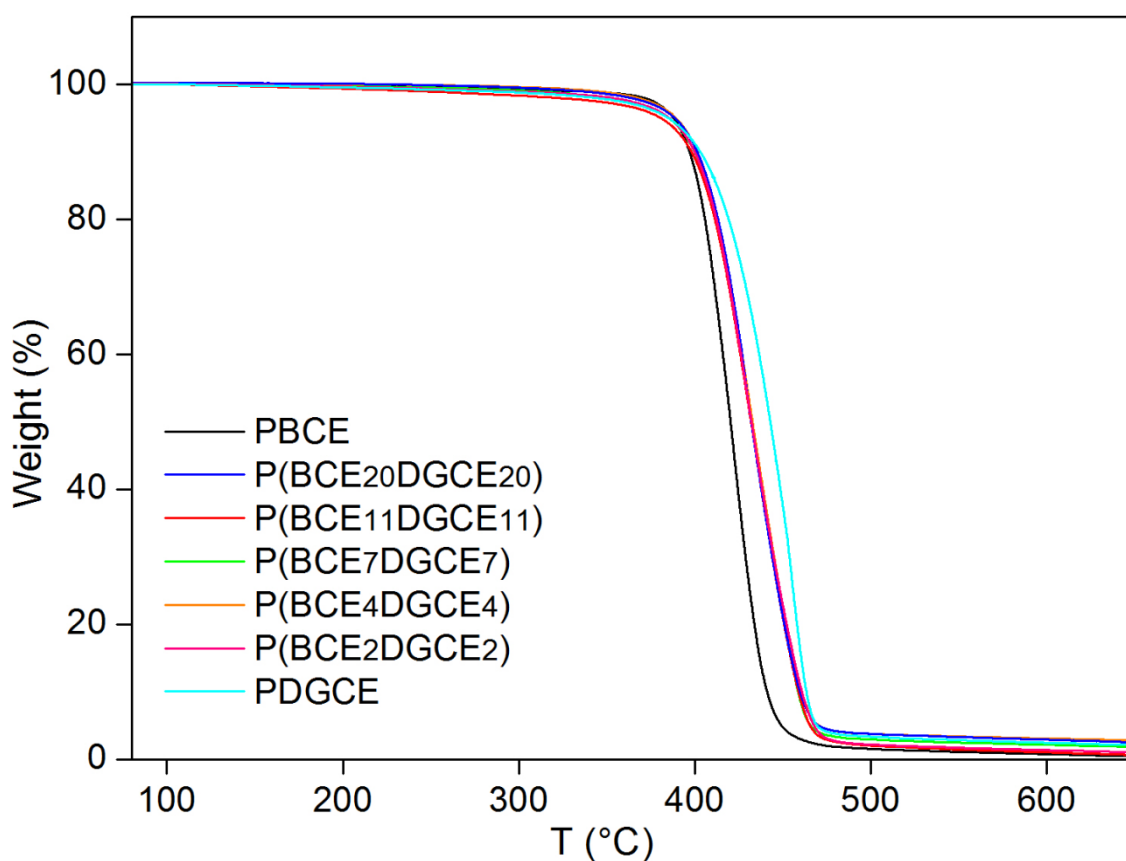


Fig. 4.5 Curve termogravimetriche di PBCE, PDGCE e dei relativi copolimeri $P(BCE_xDGCE_x)$.

Successivamente, omopolimeri e copolimeri sono stati sottoposti a misure calorimetriche: il peso molecolare, elevato e comparabile, dei campioni in esame permette di escludere una sua influenza sulle proprietà termiche, dipendenti unicamente dalla struttura delle macromolecole.

Dalle curve calorimetriche, riportate in figura 4.6, è possibile notare come tutti i campioni presentino una variazione endotermica della linea di base, associata alla transizione vetrosa. Inoltre, ad eccezione del

PDGCE che è completamente amorfo, tutti i poliesteri risultano semicristallini, mostrando un'endoterma di fusione. I dati ottenuti ci permettono, dunque, di evidenziare come i due omopolimeri presentino un comportamento di fase opposto: il PBCE è un materiale semicristallino, mentre il PDGCE è completamente amorfo. Per quanto concerne i copolimeri, invece, essi risultano caratterizzati da un comportamento di fase analogo al PBCE.

Nel caso del PBCE, il picco di fusione si manifesta ad alta temperatura (166 °C); ciò è imputabile all'elevata rigidità conferita alla struttura dalla presenza dell'anello alifatico e dalla simmetria impartita dall'elevata percentuale di conformazione *trans*. Tutti i copolimeri in oggetto presentano una temperatura di fusione e un calore di fusione significativamente inferiori rispetto al PBCE; questo differente comportamento termico è attribuibile alla presenza degli atomi di ossigeno che, a causa del loro minore raggio di Van der Waals rispetto ai gruppi metilenici (O, 1.4 Å; $-\text{CH}_2-$, 2.0 Å), provocano una diminuzione della simmetria della catena polimerica, con conseguente riduzione della capacità di cristallizzare.

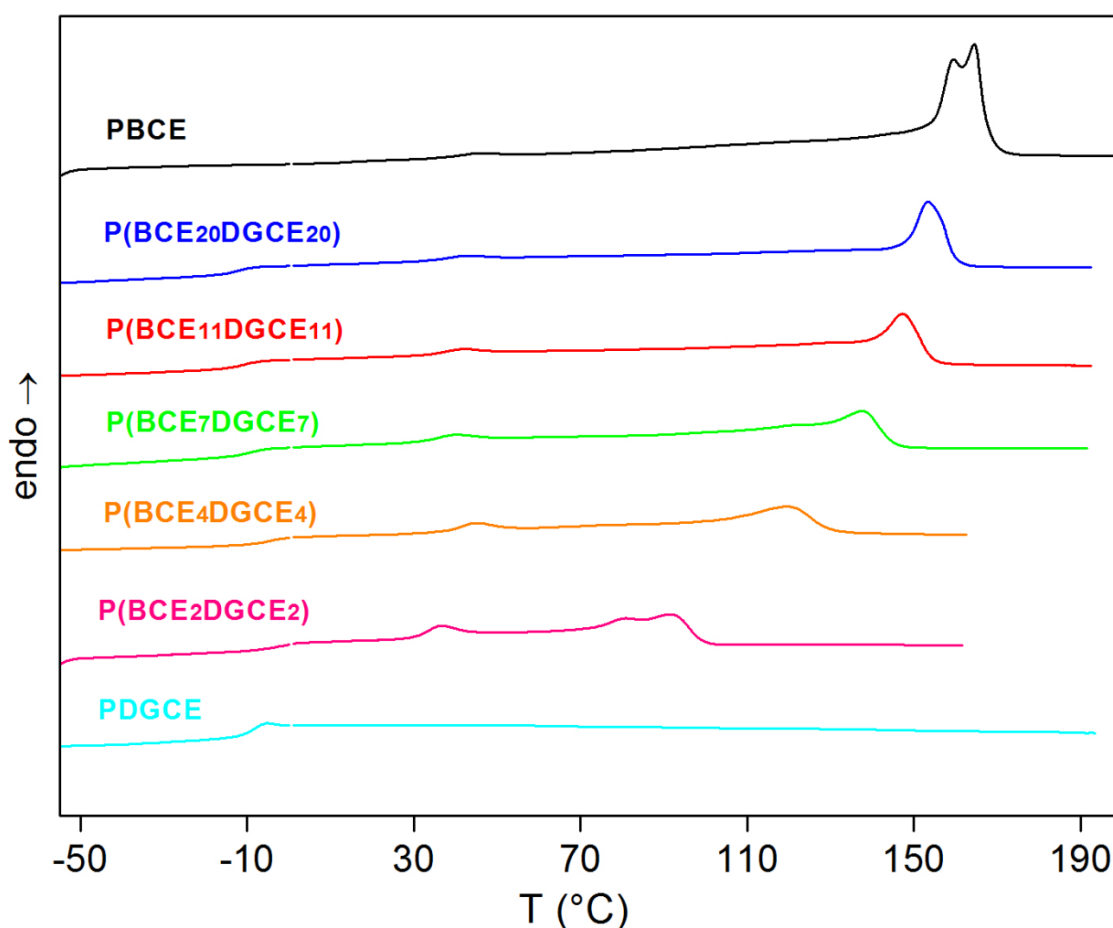


Fig. 4.6 Curve calorimetriche di PBCE, PDGCE e dei relativi copolimeri $\text{P}(\text{BCE}_x\text{DGCE}_x)$ (I Scansione).

Tra i diversi copolimeri, invece, è possibile notare un graduale spostamento del picco di fusione principale, al variare del tempo di mescolamento, cioè della lunghezza dei blocchi. In particolare, la temperatura di fusione diminuisce regolarmente al diminuire del valore di L_{BCE} , a causa della formazione di una fase

cristallina caratterizzata da un minor grado di perfezione. Allo stesso tempo, la diminuzione della lunghezza dei blocchi cristallizzabili comporta anche una riduzione del calore di fusione, indice di un abbassamento del valore di cristallinità. La maggiore cristallinità dei copolimeri contenenti blocchi lunghi può essere spiegata sulla base della loro maggiore capacità a cristallizzare, dovuta alla presenza di lunghe sequenze cristallizzabili (blocchi BCE). Nel caso di blocchi corti l'arrangiamento delle catene in un assetto ordinato risulta, invece, sfavorito dalla presenza di segmenti non cristallizzabili (blocchi DGCE).

Nel caso dei copolimeri è evidente la presenza di un picco di prefusione, intorno ai 40°C, attribuibile alla presenza di cristalli con minore grado di perfezione. Si nota, inoltre, un allargamento dell'endoterma di fusione, tanto maggiore quanto più corti sono i blocchi delle due unità. Questo risultato conferma ulteriormente la presenza di cristalliti con una più ampia distribuzione di gradi di perfezione, che fondono a temperature diverse. Infine, tanto il PBCE quanto il copolimero statistico risultano caratterizzati da picchi multipli di fusione, che possono essere attribuiti a processi di fusione/ricristallizzazione durante la scansione calorimetrica, tipici dei poliesteri.

Al fine di verificare la natura della fase cristallina e calcolare il grado di cristallinità (χ_c), i campioni sono stati studiati mediante diffrazione a raggi X: i diagrammi di diffrazione del PBCE e dei copolimeri $P(BCE_xDGCE_x)$ sono riportati in figura 4.7. I profili sono tipici dei materiali semicristallini avendo alcuni riflessi ben evidenti, caratteristici della porzione ordinata del materiale, sovrapposti ad una linea di base a campana, dovuta alla presenza di materiale amorfo.

I copolimeri, eccetto il $P(BCE_2DGCE_2)$, mostrano lo stesso diagramma di diffrazione, caratterizzato da 4 intensi picchi a 15.2°, 18.1°, 20.7°, 22.8° (2θ) e da uno meno intenso a 28.8°. Il profilo del PBCE risulta estremamente simile ma presenta anche alcuni riflessi a 16.2°, 19.2° e 19.6°, non rilevabili nei copolimeri sopra citati. Gli spettri sono caratterizzati da picchi che si mantengono relativamente intensi e ben definiti per tutti i campioni, pur mostrando lievi spostamenti non correlabili al variare della lunghezza dei blocchi. Fa eccezione il campione $P(BCE_2DGCE_2)$ il quale presenta un diagramma nettamente differente, lasciando supporre la presenza di una diversa fase cristallina caratterizzata da un riflesso principale, largo e scarsamente intenso, a 16.5° seguito da riflessi a 18.5°, 19.8°, 20.8°. In base a questa osservazione, è possibile proporre che i picchi a 16.2°, 19.2° e 19.6° del PBCE appartengano a una seconda fase cristallina, osservabile anche nel copolimero $P(BCE_2DGCE_2)$.

I dati dei campioni in analisi, riportati in tabella 4.2, evidenziano come i gradi di cristallinità dei copolimeri risultino inferiori rispetto a quello del PBCE. Tali valori presentano, inoltre, una progressiva diminuzione all'aumentare del tempo di reazione, indice di un minore grado di ordine della struttura al diminuire della lunghezza dei blocchi. Sfortunatamente, non è stato possibile calcolare il valore di χ_c del campione $P(BCE_2DGCE_2)$, data l'impossibilità di escludere il contributo dovuto alla seconda fase cristallina presente.

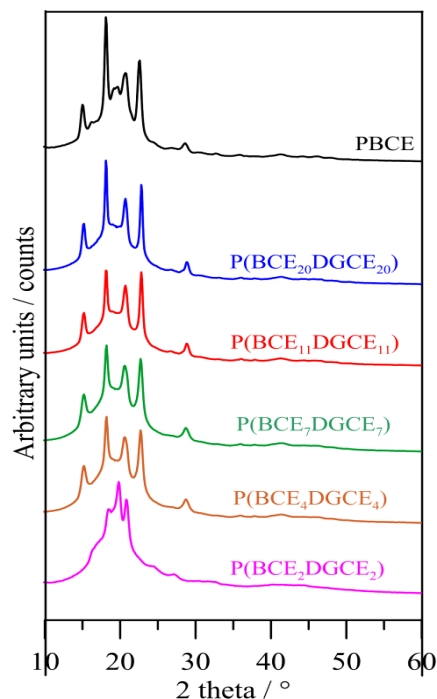


Fig. 4.7 Diagrammi di diffrazione di PBCE e dei relativi copolimeri P(BCE_xDGCE_x).

Per confermare la minore tendenza a cristallizzare dei copolimeri rispetto al PBCE, sono stati condotti esperimenti di cristallizzazione in condizioni non isoterme, sottoponendo i campioni a un raffreddamento del fuso a velocità controllata. Tali analisi hanno permesso la determinazione della temperatura corrispondente al massimo del picco di cristallizzazione (T_{cc}), che risulta correlabile alla velocità di cristallizzazione del materiale in condizioni isoterme. I picchi esotermici di cristallizzazione dei campioni sono mostrati in figura 4.8, mentre i valori di T_{cc} sono riportati in tabella 4.2.

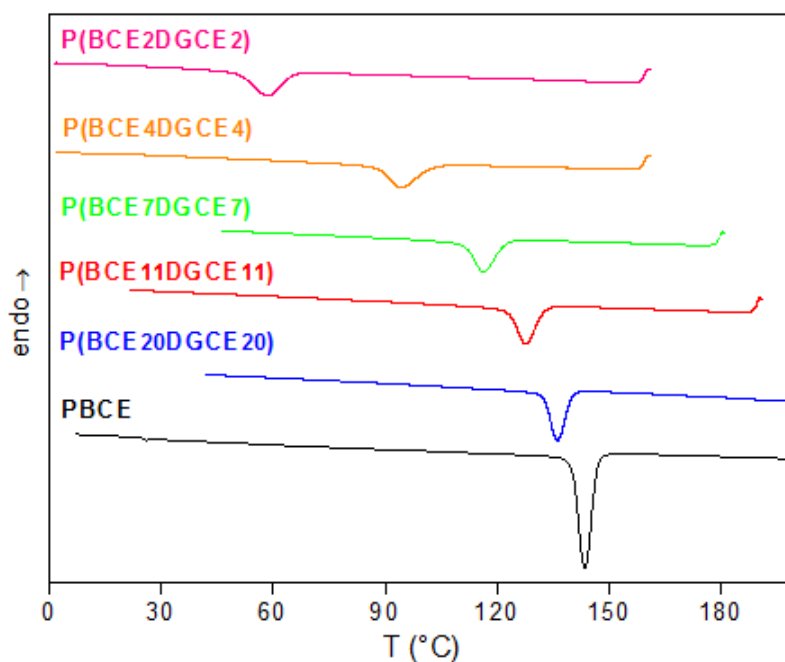


Fig. 4.8 Curve calorimetriche di cristallizzazione di PBCE e dei relativi copolimeri P(BCE_xDGCE_x).

Come si può notare dai dati riportati in tabella 4.2, la temperatura corrispondente al massimo del picco di cristallizzazione esoterma diminuisce regolarmente all'aumentare del tempo di mescolamento e quindi al diminuire della lunghezza dei blocchi cristallizzabili (BCE). Questo andamento riflette una maggiore difficoltà nel processo di cristallizzazione, imputabile all'effetto delle sequenze DGCE, che ostacolano il regolare processo di impaccamento delle catene polimeriche del PBCE. I dati riportati evidenziano dunque una progressiva diminuzione della velocità di cristallizzazione al diminuire della lunghezza dei blocchi.

Per quanto riguarda la transizione vetrosa, dal grafico in figura 4.6 e dai dati riportati in tabella 4.2, è evidenziabile una notevole differenza nei valori di T_g dei due omopolimeri. Mentre la curva calorimetrica del PDGCE, come atteso per un materiale completamente amorfo, presenta una netta variazione endotermica della linea di base a circa -7°C , il PBCE è caratterizzato da una transizione vetrosa a circa 12°C , poco evidente a causa della sua elevata cristallinità. La cospicua differenza di T_g è in accordo con la diversa struttura chimica dei due omopolimeri; è ben noto, infatti, che l'introduzione, lungo una catena polimerica contenente anelli rigidi, di atomi di ossigeno etero comporta un aumento della flessibilità di catena e una conseguente diminuzione di T_g . Anche i copolimeri, come prevedibile, mostrano una T_g nettamente inferiore a quella del PBCE. Inoltre, la loro curva calorimetrica è caratterizzata da un'unica transizione vetrosa, indicazione della presenza di uno stato amorfo omogeneo. La miscibilità dei due componenti nella fase amorfa è stata ulteriormente indagata analizzando il comportamento termico dei campioni dopo rapido raffreddamento dal fuso ("quenching"). Utilizzando una velocità di raffreddamento superiore alla velocità di cristallizzazione del polimero risulta, infatti, possibile impedirne la completa cristallizzazione; in tal modo si ottiene un materiale con grado di cristallinità sufficientemente basso da permettere di rilevare, in fase di riscaldamento, un fenomeno di transizione vetrosa intenso.

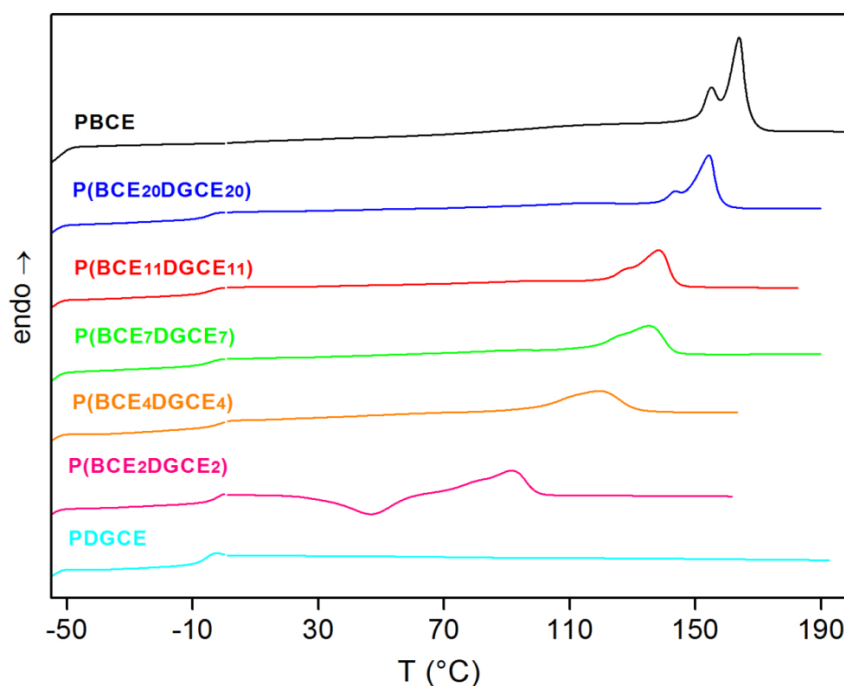


Figura 4.9 Curve calorimetriche di PBCE, PDGCE e dei relativi copolimeri $P(\text{BCE}_x\text{DGCE}_x)$ (II Scansione).

Le curve calorimetriche dei campioni sottoposti a tale trattamento sono riportate in figura 4.9. Tutti i copolimeri, eccetto il $P(BCE_2DGCE_2)$, presentano una variazione endoterma della linea di base, associata al fenomeno di transizione vetrosa, seguita da un picco di fusione a più alta temperatura. La presenza di endoterme di fusione indicano che il raffreddamento non è stato sufficientemente veloce da permettere l'ottenimento di polimeri completamente vetrificati nello stato amorfo; tale fenomeno risulta in accordo con quanto previsto dai valori di T_{cc} di questi materiali, che riflettono un'elevata velocità di cristallizzazione. Fa eccezione il $P(BCE_2DGCE_2)$, la cui curva calorimetrica risulta, invece, caratterizzata da una transizione vetrosa, seguita da un picco esotermo di cristallizzazione e da uno di fusione a più alta temperatura. L'entalpia associata al fenomeno di cristallizzazione risulta praticamente comparabile al calore di fusione, indicando la natura totalmente amorfa del polimero. Il comportamento di fase dei copolimeri risulta, quindi, dipendere dal tempo di mescolamento (e, dunque, dalla lunghezza dei blocchi): si può notare come si ottiene un materiale completamente amorfo esclusivamente per lunghi tempi di mescolamento. I dati ottenuti per i copolimeri indicano un aumento, seppur modesto, del valore di T_g all'aumentare del tempo di mescolamento. L'andamento osservato può essere spiegato supponendo che la diminuzione della lunghezza dei blocchi comporti una progressiva attenuazione dell'effetto flessibilizzante delle sequenze contenenti l'ossigeno etero, in quanto meno estese.

Per confermare l'andamento trovato con le misure calorimetriche ed altresì confermare la completa miscibilità del sistema nella fase amorfa, si è scelto di effettuare misure dinamico-meccaniche che, grazie alla loro maggiore sensibilità, permettono di determinare con precisione transizioni caratterizzate da un basso calore latente. La figura 4.10 mostra, a titolo di esempio, lo spettro DMTA del campione $P(BCE_7DGCE_7)$ mentre in tabella 4.3 sono riportate le temperature dei picchi di rilassamento di $\tan\delta$ dei copolimeri e, a titolo di confronto, del PBCE.

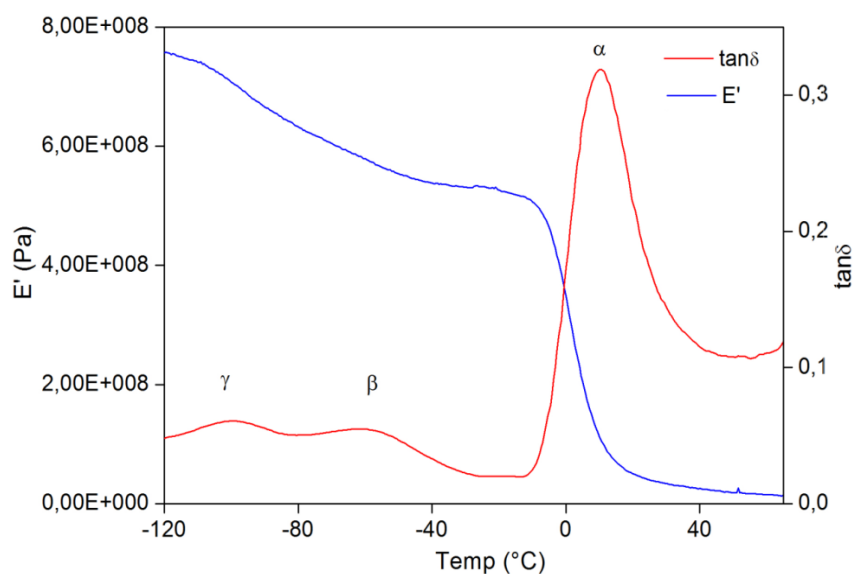


Fig. 4.10 Curve dinamico-meccaniche di $P(BCE_7DGCE_7)$.

Non è stato, purtroppo, possibile sottoporre il PDGCE ad analisi dinamico-meccanica, in quanto la bassa temperatura di transizione vetrosa (ben al di sotto della temperatura ambiente) e la sua natura amorfa non hanno permesso l'ottenimento dei provini necessari.

Tutti i campioni mostrano, nell'intervallo compreso tra -150°C e 130°C, tre picchi di rilassamento di $\tan\delta$, definiti γ , β e α , in ordine di temperatura crescente. Inoltre, dall'osservazione del grafico in figura 4.10 è possibile notare come il modulo elastico (E') presenti, inizialmente, un lieve calo legato a fenomeni di espansione termica, seguito da una ripida diminuzione (circa due ordini di grandezza) in corrispondenza del rilassamento α .

Tabella 4.3 Temperature relative ai picchi di rilassamento di PBCE e dei relativi copolimeri $P(BCE_xDGCE_y)$.

Polimero	T_α (°C)	T_β (°C)	T_γ (°C)
PBCE	40	-59	-99
$P(BCE_{20}DGCE_{20})$	5	-58	-96
$P(BCE_{11}DGCE_{11})$	8	-62	-100
$P(BCE_7DGCE_7)$	9	-61	-100
$P(BCE_4DGCE_4)$	10	-69	-102
$P(BCE_2DGCE_2)$	16	-58	-103

4.3 Caratterizzazione meccanica

Prendendo in considerazione le possibili applicazioni dei polimeri oggetto di studio, l'analisi delle proprietà meccaniche risulta di cruciale interesse. Tali proprietà sono state investigate su campioni in forma di film, mediante misure sforzo-deformazione in trazione, allungando un provino di forma rettangolare a velocità costante e misurando lo sforzo al variare della deformazione. Per ogni campione, le misure sono state effettuate su 6 provini diversi, riportando i risultati come valore medio delle 6 prove \pm deviazione standard. La tabella 4.4 riporta i valori di modulo elastico (E), di sforzo a rottura (σ_b) e di deformazione a rottura (ϵ_b) di PBCE e dei copolimeri $P(BCE_xDGCE_x)$. Non è stato possibile effettuare alcuna caratterizzazione meccanica sull'omopolimero PDGCE, in quanto la sua natura amorfa e la bassa temperatura di transizione vetrosa impediscono l'ottenimento dei film da sottoporre a tale analisi.

Si evince come l'omopolimero PBCE sia, tra i materiali studiati nella presente tesi, quello più rigido, in quanto caratterizzato da un valore di modulo elastico (E) nettamente superiore rispetto ai copolimeri. Esso presenta, inoltre, un valore estremamente basso di deformazione a rottura, mostrando un comportamento tipico dei materiali fragili.

Tabella 4.4 Modulo elastico (E), sforzo (σ_b) e allungamento a rottura (ϵ_b) per PBCE e i relativi copolimeri P(BCE_xDGCE_y).

Polimero	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
PBCE	459 ± 11	33 ± 1	31 ± 11
P(BCE ₂₀ DGCE ₂₀)	92 ± 15	7 ± 1	29 ± 4
P(BCE ₁₁ DGCE ₁₁)	75 ± 14	7 ± 1	45 ± 10
P(BCE ₇ DGCE ₇)	80 ± 7	9 ± 1	103 ± 26
P(BCE ₄ DGCE ₄)	100 ± 7	10 ± 2	240 ± 66
P(BCE ₂ DGCE ₂)	121 ± 5	15 ± 2	785 ± 74

Le prove di trazione hanno evidenziato chiaramente come l'introduzione dell'unità DGCE all'interno della catena di PBCE comporti una variazione delle proprietà meccaniche del materiale, provocando una netta diminuzione del modulo elastico, in tutto l'intervallo di valori di lunghezza dei blocchi. La deformazione a rottura, invece, si differenzia significativamente da quella del PBCE solo nei campioni con blocchi più corti ($L_{BCE} \leq 7$), mostrandosi invece equivalente nei copolimeri con blocchi lunghi.

Per quanto riguarda il modulo elastico, gli andamenti riscontrati nel sistema P(BCE_xDGCE_y) non permettono di individuare una correlazione diretta tra i valori ottenuti e la lunghezza dei blocchi. Al diminuire di L_{BCE} , infatti, il modulo presenta una diminuzione iniziale tra P(BCE₂₀DGCE₂₀) e P(BCE₁₁DGCE₁₁), seguita da un regolare incremento tra P(BCE₇DGCE₇) e P(BCE₂DGCE₂). Per interpretare il complesso andamento osservato, è stato necessario basarsi sui seguenti parametri:

- flessibilità di catena, influenzata dalla presenza degli eteroatomi e, in particolare, dal valore di lunghezza dei blocchi;
- quantità di fase cristallina presente.

Poiché tali parametri presentano, al variare della lunghezza dei blocchi, andamenti opposti, il valore di modulo rilevato dipenderà dal prevalere dell'uno o dell'altro effetto. I bassi valori di modulo elastico dei copolimeri, rispetto al PBCE, possono essere, dunque, ascrivibili sia alla loro minore cristallinità che a una maggiore flessibilità di catena, dovuta all'introduzione dell'atomo di ossigeno.

Osservando i dati relativi ai copolimeri P(BCE₂₀DGCE₂₀) e P(BCE₁₁DGCE₁₁), il calo del modulo elastico può essere ricondotto alla diminuzione del valore di cristallinità, evidenziato sia dalla minore entalpia di fusione che dal minore grado di cristallinità (tabella 4.2), essendo la flessibilità di catena (ricollegabile ai dati di T_g presenti in tabella 4.2 e 4.3) praticamente comparabile. Tale ipotesi risulta confermata dai simili valori di modulo riscontrati nei copolimeri P(BCE₁₁DGCE₁₁) e P(BCE₇DGCE₇), caratterizzati da analoga cristallinità e flessibilità. Tra P(BCE₇DGCE₇) e P(BCE₂DGCE₂), è possibile osservare un regolare aumento del modulo elastico; questo andamento non può essere certamente imputato al grado di cristallinità dei copolimeri,

che diminuisce, ma può essere giustificato sulla base della progressiva diminuzione di flessibilità della catena, dovuta alla presenza di sequenze DGCE sempre più corte.

Per quanto riguarda l'allungamento a rottura, è possibile osservare un regolare incremento al diminuire della lunghezza dei blocchi, in totale accordo con la progressiva diminuzione della cristallinità dei copolimeri in oggetto.

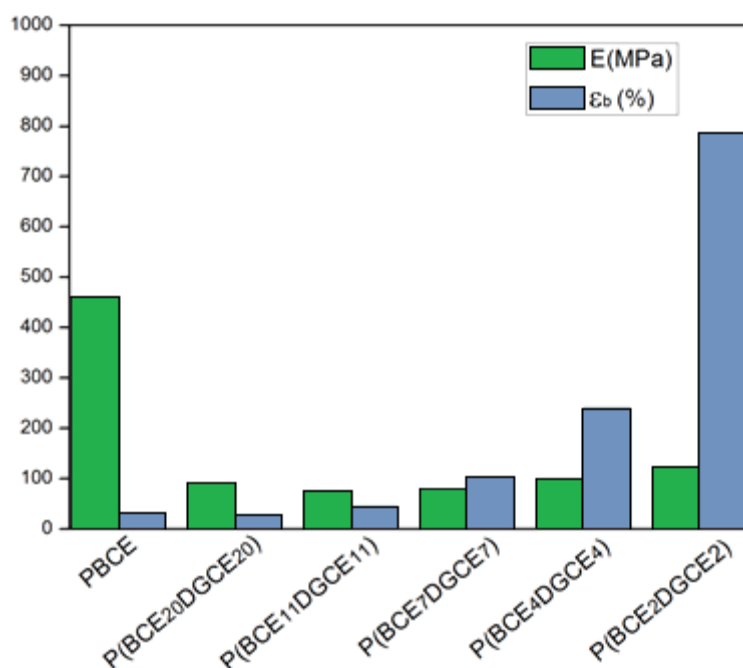


Fig. 4.11 Confronto tra i valori di modulo elastico (E) e deformazione a rottura (ϵ_b) tra il PBCE e campioni copolimerici.

Ai fini di future applicazioni, può risultare interessante sottolineare che i copolimeri con $L_{BCE} \leq 7$ sono caratterizzati da un comportamento elastomerico.

4.4 Misure di bagnabilità

Al fine di indagare l'idrofilità dei polimeri sintetizzati, i film sono stati sottoposti a misure di angolo di contatto con acqua e i risultati ottenuti sono stati riportati in tabella 4.5.

Non è stato possibile sottoporre l'omopolimero PDGCE a tali misure, poiché la sua natura amorfa e la bassa temperatura di transizione vetrosa ne hanno impedito l'ottenimento in forma di film. A titolo di esempio, in figura 4.12 sono state mostrate le immagini relative ad alcuni dei film polimerici in oggetto.

Il PBCE (con un angolo di contatto di 110°) risulta essere il materiale più idrofobico tra quelli esaminati. La minore affinità del PBCE all'acqua, rispetto alla serie di copolimeri, dipende dalla presenza di atomi di ossigeno che conferiscono polarità alla struttura.

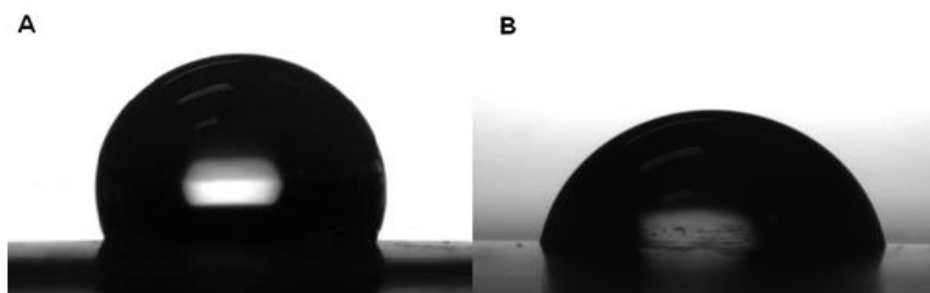


Fig. 4.12 Gocce d'acqua depositate su campioni A) PBCE B) P(BCE₂₀DGCE₂₀).

Tra i copolimeri, è possibile evidenziare come il P(BCE₂₀DGCE₂₀) mostri la maggiore idrofilicità, dovuta alla presenza di lunghe catene contenenti legami polari C-O. I restanti copolimeri si sono dimostrati tutti lievemente idrofili (WCA < 90°) e mostrano valori estremamente simili tra loro, rendendo impossibile l'osservazione di andamenti legati alla lunghezza dei blocchi o alla morfologia del materiale.

Tabella 4.5 Valori di idrofilicità (WCA) relativi al PBCE e ai copolimeri P(BCE_xDGCE_x).

Polimero	WCA
PBCE	110 ± 2
P(BCE ₂₀ DGCE ₂₀)	84 ± 2
P(BCE ₁₁ DGCE ₁₁)	89 ± 1
P(BCE ₇ DGCE ₇)	88 ± 2
P(BCE ₄ DGCE ₄)	89 ± 1
P(BCE ₂ DGCE ₂)	87 ± 2

4.5 Studi di degradazione idrolitica

L'omopolimero PBCE e i cinque campioni copolimerici in esame sono stati sottoposti a esperimenti di degradazione idrolitica *in vitro* in condizioni fisiologiche di temperatura (37°C) e di pH (7.4). Tali esperimenti sono stati condotti al fine di valutare la tempistica di degradazione di questi materiali nell'ottica di utilizzarli come biomateriali impiantabili all'interno dell'organismo.

I test di biodegradazione sono stati condotti in duplicato su film polimerici mantenuti in tampone fosfato per un massimo di 180 giorni; il primo prelievo è stato effettuato a 28 giorni dall'incubazione e i successivi si sono susseguiti ad intervalli di tre settimane per i copolimeri, di sei settimane per il PBCE.

Si sono ottenute informazioni relative al decorso del processo di degradazione caratterizzando ciascun campione parzialmente degradato mediante misure di perdita di peso, poste in confronto con il peso a secco di ciascun campione prima dell'inizio delle prove di degradazione.

Di ciascun campione sottoposto a degradazione idrolitica è stato, infatti, calcolato il peso residuo percentuale ($m_R\%$) attraverso la seguente equazione:

$$m_R\% = 100 - \left(\frac{m_{in} - m_{fin}}{m_{in}} \cdot 100 \right)$$

dove m_{fin} è la massa del campione misurata dopo il processo di degradazione e m_{in} è la massa iniziale del campione.

Dei medesimi campioni è stata, inoltre, ricavata la distribuzione dei pesi molecolari mediante misura GPC. Da tali dati sono stati calcolati i rispettivi valori di peso molecolare medio numerico residuo percentuale ($M_{n-R}\%$), calcolato con la seguente equazione:

$$M_{n-R}\% = 100 - \left(\frac{M_{n-in} - M_{n-fin}}{M_{n-in}} \cdot 100 \right)$$

dove M_{n-fin} è il peso molecolare medio numerico del campione dopo il processo di degradazione e M_{n-in} è il peso molecolare medio numerico iniziale del campione.

Nelle seguenti figure sono riportati gli andamenti del $m_R\%$ e del $M_{n-R}\%$ in funzione del tempo di incubazione.

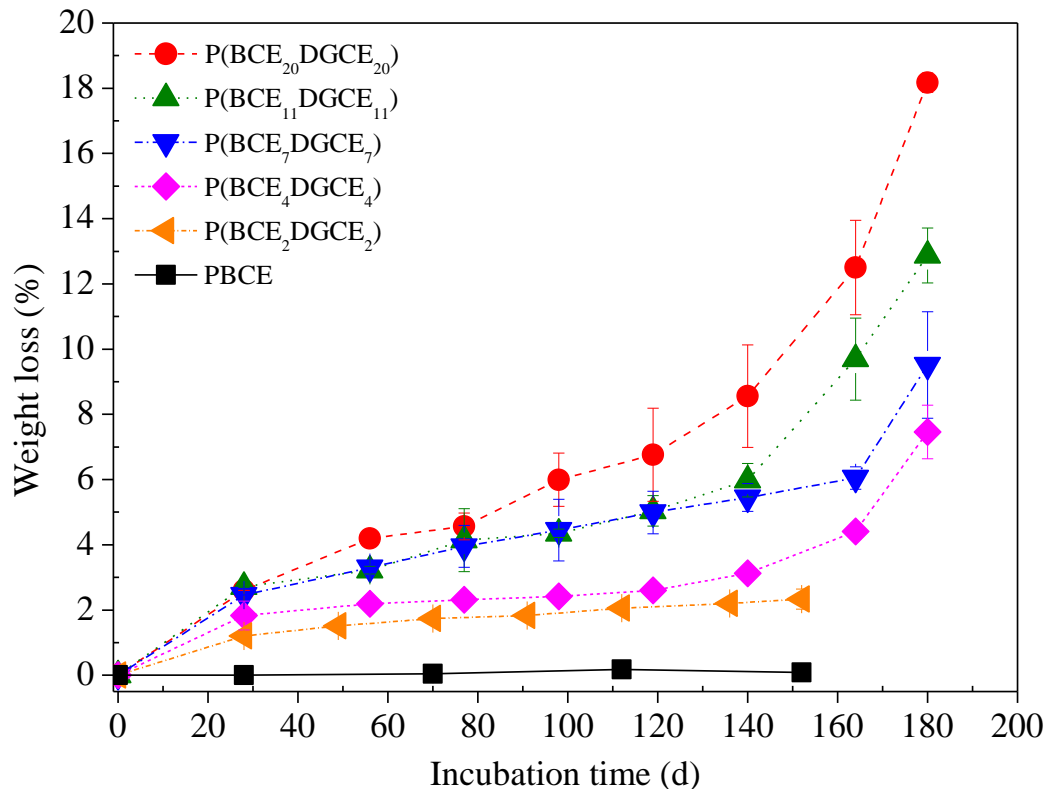


Fig. 4.13 Perdita di peso percentuale in funzione del tempo di incubazione per il PBCE e i copolimeri P(BCE_xDGCE_y).

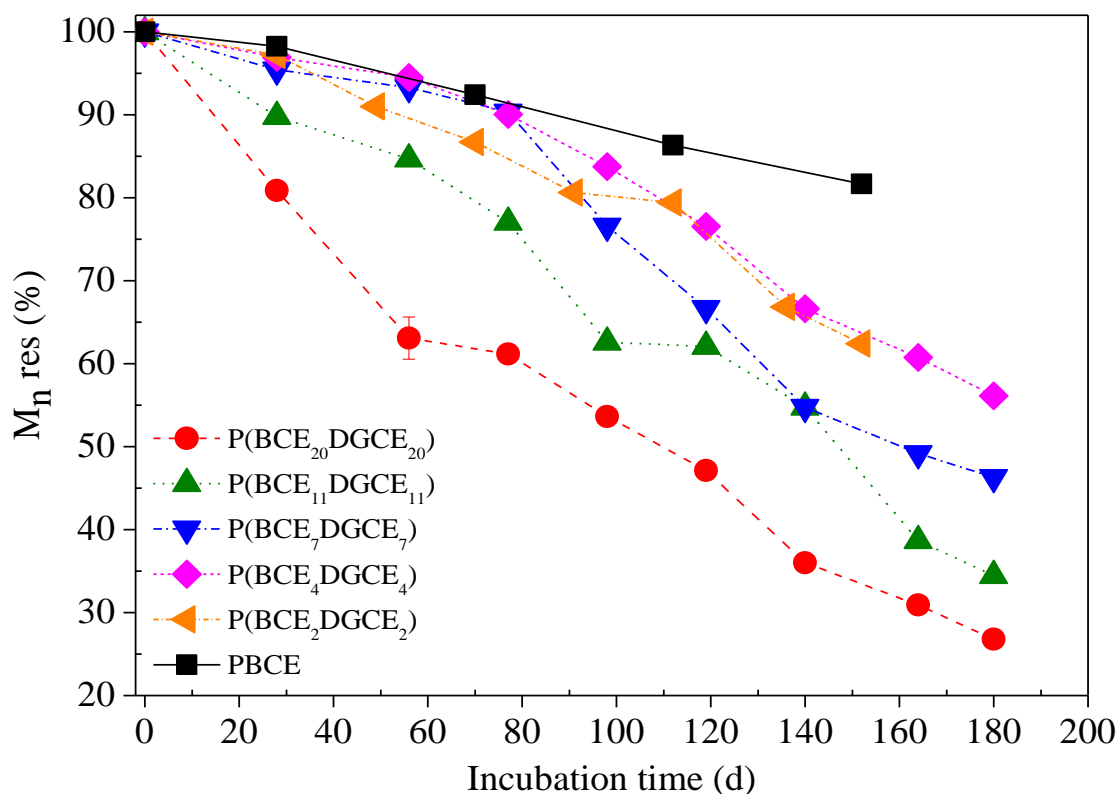


Fig. 4.14 Peso molecolare medio numerico residuo in funzione del tempo di incubazione per il PBCE e i copolimeri P(BCE_xDGCE_y)..

Il grafico in figura 4.13 mostra che il processo di degradazione ha avuto effetti marcati sui campioni copolimerici mentre, per i tempi di incubazione considerati, l'omopolimero PBCE non presenta significative perdite di peso: tale risultato è senza dubbio legato al maggiore grado di cristallinità, al buon livello di perfezione dei cristalli, alla alta temperatura di fusione e all'idrofobicità di questo polimero rispetto ai campioni di copolimero.

Da entrambi gli andamenti riportati si osserva però, che gli effetti della degradazione idrolitica risultano tanto più evidenti quanto maggiore è la lunghezza dei blocchi del campione, nonostante il maggiore grado di cristallinità; ciò è probabilmente da attribuirsi al fatto che i campioni a blocchi più lunghi presentano porzioni di catena più estese caratterizzate dalla presenza dell'atomo di ossigeno etero, che vengono attaccate preferenzialmente da parte dell'acqua. Sono in corso ulteriori analisi, tramite misure NMR, al fine di verificare eventuali sbilanciamenti dalla composizione di partenza e supportare, dunque, sperimentalmente questa assunzione.

Sia l'omopolimero che i copolimeri P(BCE_xDGCE_y) subiscono un'apprezzabile diminuzione di peso molecolare già per brevi tempi di permanenza in tampone e tale diminuzione continua in maniera progressiva con l'aumentare del tempo di incubazione, come mostrato in figura 4.14. In riferimento a ciascun campione, è interessante notare che, invece, per brevi tempi di incubazione, la perdite di peso gravimetrico non sono altrettanto significative. Questi risultati non sono sorprendenti se si tiene conto che il processo di degradazione idrolitica avviene in *bulk* e prevede la scissione statistica, da parte dell'acqua,

dei legami esterei delle macromolecole, con formazione di spezzoni di catena progressivamente più corti; pertanto, nelle prime fasi del processo, le perdite di peso non sono apprezzabili in quanto le sequenze distaccatesi dalle macromolecole non sono sufficientemente corte da diffondere attraverso la matrice polimerica e passare in soluzione; al contrario, date le scissioni dei legami esterei, il peso molecolare del campione inizia a diminuire in concomitanza all'inizio dell'incubazione in tampone. Con l'avanzare del processo di idrolisi, le sequenze formatesi diventano progressivamente più corte e quindi passano in soluzione: anche le variazioni di peso gravimetrico diventano allora significative.

I risultati evidenziati confermano che l'inserimento di co-unità DGCE nel reticolo cristallino del PBCE porta ad un significativo aumento della velocità di degradazione.

4.6 Test di biocompatibilità

L'omopolimero PBCE e i campioni copolimerici $P(BCE_xDGCE_x)$ sono stati sottoposti a test di citotossicità indiretta e diretta, avvalendosi di una popolazione di cardiomioblasti ventricolari di embrione di ratto, linea H9c2, secondo i protocolli e le procedure descritte nel paragrafo 3.7.

Di seguito sono riportati e discussi i risultati di entrambi i test.

Test di citotossicità indiretta

Tramite test di citotossicità indiretta è stata possibile la verifica dell'eventuale liberazione nel medium di coltura, da parte dei supporti polimerici testati, di prodotti di degradazione in grado di provocare effetti di citotossicità e/o citostasi indotti.

Nel grafico presentato in figura 4.15 sono mostrati i valori di fluorescenza (in unità arbitrarie), relativi alle cellule coltivate con medium standard (terreno di coltura DMEM che non era stato precedentemente incubato con i polimeri da testare) e con medium DMEM preincubato con i vari film polimerici.

I valori di fluorescenza ottenuti dalle cellule cresciute in medium standard (PS) sono paragonabili a quelli ottenuti utilizzando il medium preincubato con l'omopolimero PBCE e con i copolimeri $P(BCE_2DGCE_2)$, $P(BCE_4DGCE_4)$, $P(BCE_7DGCE_7)$, $P(BCE_{11}DGCE_{11})$ e $P(BCE_{20}DGCE_{20})$. I risultati ottenuti dimostrano, quindi, assenza di prodotti citotossici rilasciati dai vari polimeri.

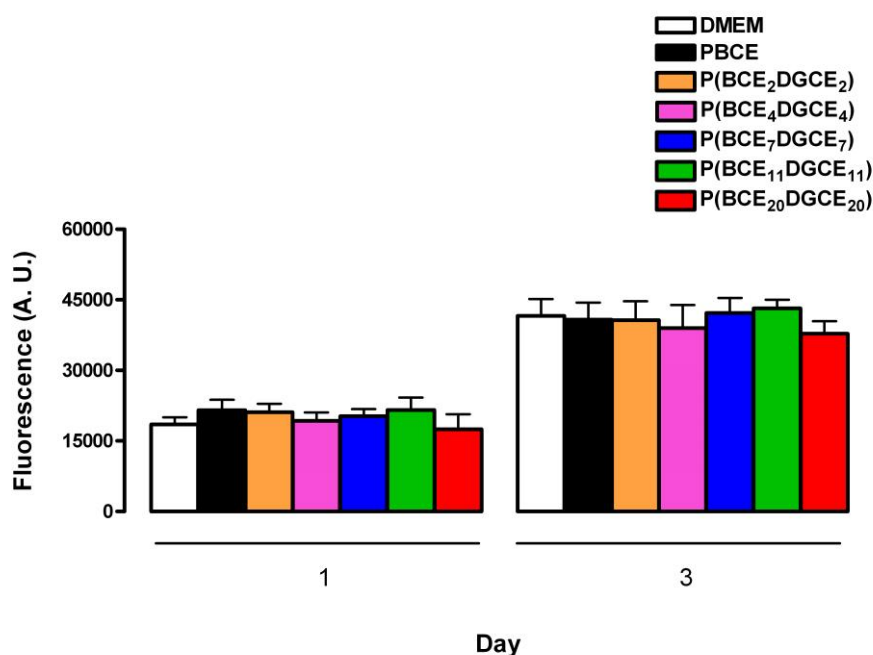


Fig. 4.15 Valutazione della citotossicità indiretta.

Test di citotossicità diretta

Le prove di citotossicità diretta, dette anche di citocompatibilità, consistono in test di adesione e proliferazione cellulare, implicanti il contatto diretto delle cellule col materiale da testare. Esse consentono di verificare l'evoluzione, in termini di vitalità, proliferazione e crescita, di una popolazione cellulare seminata a bordo.

Per svolgere questo tipo di valutazione sono stati costruiti *ad hoc* anelli di Tecaflon PVDF (polivinidildifluoruro) - biocompatibile ed inerte - del diametro di 1.7 cm su un lato dei quali far aderire i film fissati con un leggero strato di silicone. In questo modo sono stati ottenuti dei contenitori ('tamburelli', figura 4.16) nei quali si è avuta la sicurezza di seminare in uno spazio confinato sempre lo stesso numero di cellule. Per la caratterizzazione di queste prove, è stata utilizzata una popolazione di cardiomioblasti ventricolari di embrione di ratto (linea H9c2), costituita da cellule già parzialmente differenziate verso un fenotipo cardiaco. Dopo aver provveduto alla sterilizzazione di questi sistemi (secondo le modalità contenute nel paragrafo 3.8.1), 2.5×10^4 cellule della linea H9c2 sono state seminate all'interno dei 'tamburelli' precedentemente descritti e mantenute in coltura per 14 giorni (due esperimenti separati ognuno costituito da 2 replicati). Prove di vitalità e crescita cellulare sono state eseguite mediante l'utilizzo del colorante vitale PrestoBlue®, impiegato secondo le stesse modalità della citotossicità indiretta, ed effettuato nei giorni 1, 7 e 14.

Nel grafico sottostante è riportato l'andamento della crescita cellulare, espresso come segnale di fluorescenza (unità arbitrarie), letta alla lunghezza d'onda di 590 nm (Ex 540 nm). Come superficie di

riferimento per la crescita si è adoperato il polistirene, materiale costituente le piastre di coltura standard (capsule di Petri).

L'efficienza dell'adesione cellulare il giorno successivo la semina sulle varie matrici polimeriche da testare è risultata inferiore a quella ottenuta sul polistirene (PS). Ovviamente, un numero maggiore di cellule di partenza adese favorisce un più rapido raggiungimento della confluenza (polistirene: 57000 cellule già al giorno 7).

Nonostante la notevole differenza con la superficie di polistirene, il numero di cellule, presente dopo 14 giorni dalla semina sulle matrici polimeriche testate, risulta essere circa 6 volte superiore rispetto al valore di fluorescenza iniziale (giorno 1).

Tale risultato conferma, da un lato, i dati di citotossicità indiretta (assenza di materiale di degradazione rilasciato nel medium di coltura), e dall'altro testimonia la capacità della popolazione cellulare di crescere sulle matrici polimeriche in questione.

Come riportato in letteratura (Focarete, 2010), l'inconveniente di una ridotta adesione/proliferazione delle cellule su matrici polimeriche può essere ovviato da un tempo di coltura più lungo.

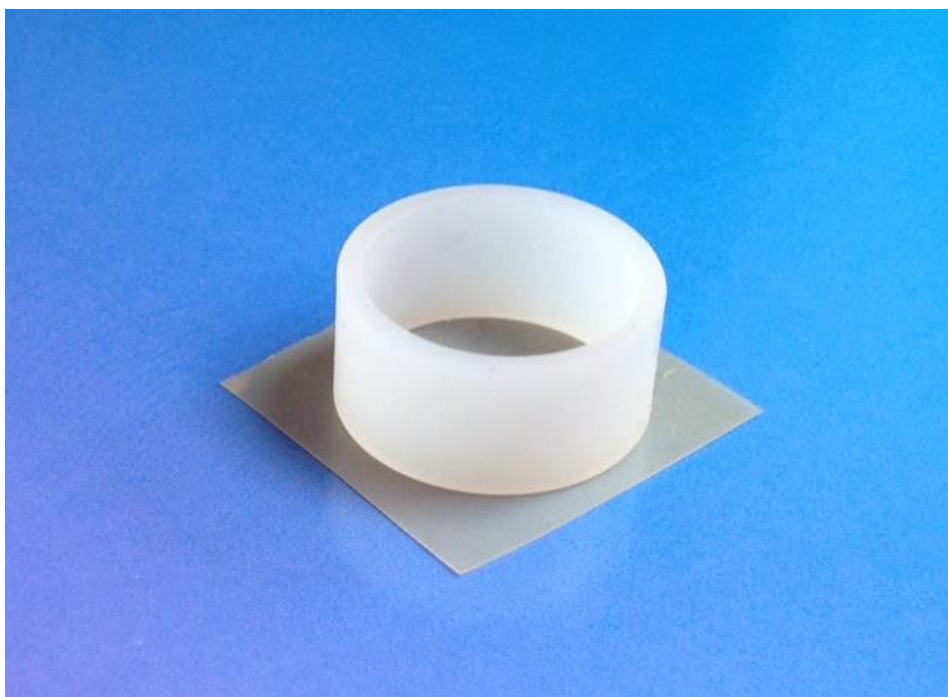


Fig. 4.16 Anello in Teflon PVDF adeso al film polimerico

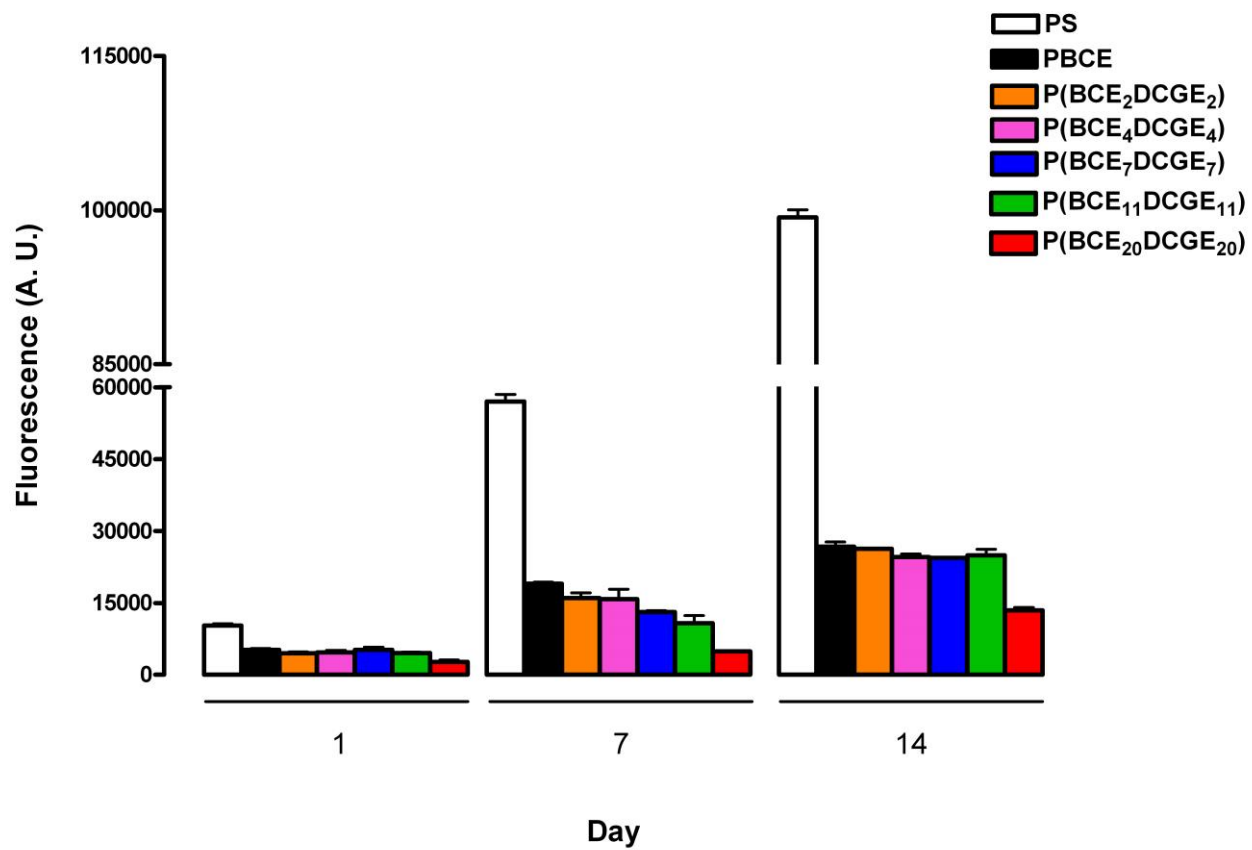


Fig. 4.17 Vitalità cellulare valutata dopo 1, 7 e 14 giorni di incubazione.

Negli ultimi trent'anni la ricerca nel settore dei biomateriali ha visto una crescita costante, che ne ha consentito l'impiego in nuove applicazioni, le quali hanno determinato il miglioramento della qualità di vita di milioni di persone. L'obiettivo odierno dei ricercatori è quello di conoscere in maniera sempre più approfondita i meccanismi coinvolti nell'interazione tessuto-biomateriale, in modo da sviluppare biomateriali e prototipi di dispositivi medici con caratteristiche chimico-fisiche che ne garantiscano, in associazione ad una certa funzionalità, un'elevata biocompatibilità. Altro obiettivo di ricerca, ugualmente prioritario, è quello di mettere a punto biomateriali con proprietà altamente specifiche e facilmente modulabili in riferimento a particolari applicazioni. In questo contesto si inseriscono i polimeri sintetici i cui principali vantaggi, rispetto alle altre classi di materiali, sono proprio una maggiore biocompatibilità, la biodegradabilità, la facile lavorabilità e la compatibilità meccanica con il sito di applicazione.

In particolare, per quanto riguarda l'ingegneria tissutale, la classe di polimeri che si è rivelata più idonea è quella dei poliesteri alifatici, le cui caratteristiche peculiari sono, appunto, la biodegradabilità e la biocompatibilità. Ad oggi l'FDA ha consentito l'uso dei soli PCL, PLA, PGA e dei loro copolimeri per la creazione di dispositivi medici impiantabili nel corpo umano; tali materiali non riescono, però, a soddisfare completamente l'ampia gamma di specifiche proprie delle applicazioni nell'ambito dell'ingegnerizzazione dei tessuti. Pertanto, la sintesi di sistemi a base di nuovi poliesteri alifatici, i cui prodotti di degradazione non risultino tossici per l'organismo e caratterizzati da proprietà modulabili in relazione a specifiche applicazioni, può aprire nuove prospettive nell'ambito dell'ingegneria tissutale.

In questo scenario si inserisce il lavoro di ricerca svolto nella presente tesi, il cui obiettivo è stato la sintesi e la successiva caratterizzazione di copolimeri alifatici con struttura a blocchi, biodegradabili e biocompatibili, aventi proprietà modulabili in base alla lunghezza media dei blocchi: a tale scopo il poli(butilene 1,4-cicloesandicarbossilato) ha rappresentato un ottimo punto di partenza per la copolimerizzazione.

La strategia di sintesi scelta, la miscelazione reattiva, si è rivelata una tecnica estremamente vantaggiosa poiché ha permesso di combinare efficacemente l'economicità e la semplicità del processo con l'ottenimento di diversi campioni di $P(BCE_xDGCE_y)$ a blocchi, aventi lunghezze dei blocchi, e quindi proprietà, modulabili semplicemente variando il tempo di reazione.

In accordo con gli obiettivi prefissati, i risultati evidenziano che l'introduzione di unità comonomeriche di PDGCE, contenenti eteroatomi di ossigeno, lungo la catena polimerica del PBCE ha avuto una notevole

influenza sulle caratteristiche chimico-fisiche dei copoliesteri risultanti, e quindi sulle loro proprietà termiche e meccaniche, nonché sul profilo di degradazione e sulla biocompatibilità.

In particolare, l'introduzione di atomi di ossigeno etero ha comportato un aumento dell'idrofilicità e una riduzione del grado di cristallinità: di conseguenza, i campioni di $P(BCE_xDGCE_y)$ presentano una velocità di degradazione idrolitica notevolmente maggiore a quella del solo PBCE e crescente all'aumentare della lunghezza dei blocchi del campione. La copolimerizzazione con il PDGCE ha determinato anche una maggiore flessibilità dei copoliesteri risultanti: la presenza dell'eteroatomo ha un effetto flessibilizzante sulla catena di PBCE, tanto più evidente quanto maggiore è la lunghezza dei blocchi del copoliestere. Occorre, inoltre, sottolineare che il sistema copolimerico è caratterizzato dal mantenimento dell'elevata stabilità termica tipica del PBCE, proprietà quest'ultima di particolare interesse in fase di lavorazione del materiale.

È stata, infine, riscontrata, benché in maniera del tutto preliminare, una buona biocompatibilità *in vitro* dei campioni di $P(BCE_xDGCE_y)$.

In conclusione, le proprietà dei copoliesteri in oggetto risultano estremamente interessanti in vista di possibili applicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale ed, in particolare, nell'ingegneria tissutale del miocardio.

Tali risultati, seppur incoraggianti, rappresentano solo un punto di partenza verso una reale applicazione dei copoliesteri qui descritti; rimane ancora da verificare la fattibilità tecnico-economica del trasferimento del processo di sintesi su scala industriale e si rendono necessari studi più approfonditi soprattutto per quanto riguarda la valutazione della biocompatibilità; a tale scopo, risultano necessari test *in vitro* mirati per analizzare, ad esempio, l'effetto delle caratteristiche meccaniche e morfologiche dei film polimerici in $P(BCE_xDGCE_x)$ sul differenziamento cellulare, prima di poter passare ai test *in vivo*.

Pietrabissa Riccardo.

'Biomateriali per protesi e organi artificiali', Patron Editore, 1996.

Chiara Gualandi, Michelina Soccio, Enrica Saino, Maria Letizia Focarete, Nadia Lotti, Andrea Munari, Lorenzo Moronig and Livia Visai.

'Easily synthesized biodegradable copolyesters with adjustable properties for biomedical applications', Soft Matter, 2012, 8, 5466.

Corrado Berti, Annamaria Celli, Paola Marchese, Elisabetta Marianucci, Simone Sullalti, Giancarlo Barbiroli.

'Environmentally Friendly Copolyesters Containing 1,4-Cyclohexane Dicarboxylate Units, 1-Relationships Between Chemical Structure and Thermal Properties', Macromolecular Chemistry and Physics, 2010, 211, 1559-1571.

Annamaria Celli, Paola Marchese, Simone Sullalti, Corrado Berti, Giancarlo Barbiroli.

'Eco-friendly Poly(butylene 1,4-cyclohexanedicarboxylate): Relationships Between Stereochemistry and Crystallization Behavior', Macromolecular Chemistry and Physics, 2011, 212, 1524-1534.

Corrado Berti, Enrico Binassi, Annamaria Celli, Martino Colonna, Maurizio Fiorini, Paola Marchese, Elisabetta Marianucci, Massimo Gazzano, Francesco Di Credico, Daniel J. Brunelle.

'Poly(1,4-cyclohexylenedimethylene 1,4-cyclohexanedicarboxylate): Influence of Stereochemistry of 1,4-Cyclohexylene Units on the Thermal Properties', 2007.

Maria Letizia Focarete, Chiara Gualandi, Mariastella Scandola, Marco Govoni, Emanuele Giordano, Laura Foroni, Sabrina Valente, Gianandrea Pasquini, Wei Gao and Richard A. Gross.

'Electrospun scaffolds of a polyhydroxyalkanoate consisting of ω -hydroxypentadecanoate repeat units: fabrication and in vitro biocompatibility studies', Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. Jun 8; 21(10): 1283-96 (2010).

Chiara Gualandi, Michelina Soccio, Marco Govoni, Sabrina Valente, Maria Letizia Focarete, Nadia Lotti, Emanuele Giordano, Andrea Munari and Gianandrea Pasquinelli.

'Poly(butylene/diethyleneglycolsuccinate) multiblock copolyester as a candidate biomaterial for soft tissue engineering: solid state properties, degradability and biocompatibility', Journal of Bioactive and Compatible Polymers. May;27(3):244-264 (2012).